

# Sinteza interferona gama u ljudskim limfocitima T nakon stimulacije antigenima Mycobacterium tuberculosis in vitro

---

Hadrović, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:740583>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek**

**Martina Hadrović**

**„Sinteza interferona gama u ljudskim limfocitima T  
nakon stimulacije antigenima *Mycobacterium  
tuberculosis in vitro*“**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2013.**

Ovaj rad, izrađen u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, na Odjelu za protočnu citometriju, pod vodstvom dr. sc. Snježane Židovec Lepej i suvodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u svrhu stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### SINTEZA INTERFERONA GAMA U LJUDSKIM LIMFOCITIMA T NAKON STIMULACIJE ANTIGENIMA *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN VITRO*

Martina Hadrović

Roosveltov trg 6, Zagreb

Procjenjuje se da je otprilike trećina stanovnika svijeta zaražena bacilom *Mycobacterium tuberculosis*. Infekcija ovim mikroorganizmom posebno je opasna za imunokompromitirane osobe, kod kojih je vjerojatnost da će latentni oblik tuberkuloze preći u aktivni veća za 21 do 34 puta u odnosu na imunokompetentne osobe, te je najčešći uzrok smrti HIV-om zaraženih osoba. Cilj istraživanja je analizirati povezanost imunskog statusa, procjenjenog na temelju broja CD4<sup>+</sup> limfocita T, i rezultata testa kvantifikacije IFN- $\gamma$  u supernatantu limfocita periferne krvi nakon stimulacije antigenima *M. tuberculosis in vitro* (kvantiferonski test) kojim se otkriva latentna tuberkuloza. Istraživanje je provedeno na uzorcima periferne krvi 783 ispitanika od kojih je ukupno 208 (26,6%) bilo zaraženo HIV-om. U skupini HIV-om zaraženih osoba, kvantiferonski test je bio pozitivan u 31 od 208 (14,9%) osoba. 167 (80,3%) ih je bilo negativno. U 10 od 208 (1,2%) HIV-om zaraženih osoba rezultat kvantiferonskog testa je bio neodrediv. U kontrolnoj skupini 173 (30%) su bili pozitivni na tuberkulozu, 364 (63,3%) negativni, te kod 37 ispitanika (6,4%) iz kontrolne skupine rezultat kvantiferonskog testa je bio neodrediv. Pronađena je korelacija između imunskog statusa i neodredivosti rezultata pa je stoga u HIV-om zaraženih osoba s opsežnom deficijencijom stanične imunosti potrebno, uz kvantiferonski test, primijeniti i druge eksperimentalne metode za dijagnostiku latentne tuberkuloze te ponoviti testiranje nakon primijenjene antiretrovirusne terapije i porasta broja CD4<sup>+</sup> limfocita T iznad 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L.

(53 stranice, 28 slika, 1 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici  
Ključne riječi: tuberkuloza, HIV, CD4<sup>+</sup> limfociti T, IGRA  
Voditelj: Dr. sc. Snježana Židovec Lepej  
Suvoditelj: Prof. dr. sc. Nada Oršolić, red. prof.  
Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Dijana Škorić

Rad prihvaćen: 9. listopada 2013.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology**

**Graduation Thesis**

### **INTERFERON GAMMA SYNTHESIS BY CD4<sup>+</sup> T LYMPHOCYTES STIMULATED BY ANTIGENS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN VITRO**

**Martina Hadrović**

**Roosveltov trg 6, Zagreb**

It is estimated that about a third of the world's population is infected with bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. Infection with this microorganism is specially dangerous for immunocompromised persons, in which the probability of latent form of TB progressing into the active form is 21-34 times greater than in immunocompetent individuals, and hence is the most common cause of death in HIV infected individuals. The aim of the research is to analyze the connection between immune status, estimated on the basis of the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and test results of quantification of IFN- $\gamma$  in the supernatant of peripheral blood lymphocytes after stimulation with antigens of *M. tuberculosis in vitro* (QuantiFERON assay) which detects latent tuberculosis. The study was conducted on samples of peripheral blood of 783 patients, of which a total of 208 (26.6%) were infected with HIV. In the group of HIV-infected persons, QuantiFERON assay was positive in 31 of 208 (14.9%) individuals. 167 (80.3%) were negative. In 10 of 208 (1.2%) HIV-infected persons QuantiFERON assay result was indeterminate. In the control group, 173 (30%) were positive for TB, 364 (63.3%) negative, and in 37 patients (6.4%) in the control group QuantiFERON assay result was indeterminate. We found a correlation between the immune status and indeterminate results and therefore conclude that in HIV-infected people with extensive deficiency of cellular immunity necessary to perform QuantiFERON assay, it is necessary to implement other experimental methods for the diagnosis of latent tuberculosis and repeat testing after administration of antiretroviral therapy and consequently increased number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes above 200 CD4<sup>+</sup> T cells/ $\mu$ L.

(53 pages, 28 figures, 1 table, 45 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library  
Key words: tuberculosis, HIV, CD4 T cell, IGRA  
Supervisor: Dr. sc. Snježana Židovec Lepej  
Co-supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Prof.  
Reviewers: Dr. sc. Dijana Škorić, Prof.

Thesis accepted: 9 October 2013.

# SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	2
1.2. RAZVOJ TUBERKULOZE I IMUNOSNI ODGOVOR DOMAĆINA.....	7
1.3. ZDRAVSTVENO ZNAČENJE I RAŠIRENOST TUBERKULOZE.....	12
1.4. TUBERKULOZA I HIV.....	13
1.5. DIJAGNOSTIKA TUBERKULOZE.....	17
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	22
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	24
3.1. ISPITANICI.....	25
3.2. BIOLOŠKI UZORCI.....	25
3.2.1. Biološki uzorci za protočnu citometriju.....	25
3.2.2. Biološki izorci za QuantiFERON-TB Gold In Tube test.....	25
3.3. REAGENSI.....	26
3.3.1. Reagensi za protočnu citometriju.....	26
3.3.2. Reagensi za QuantiFERON-TB Gold In Tube test.....	27
3.4. POTROŠNI MATERIJAL.....	28
3.4.1. Potrošni materijal za protočnu citometriju.....	28
3.4.2. Potrošni materijal za QuantiFERON-TB Gold In Tube test.....	28
3.5. PRIBOR I INSTRUMENTI.....	28
3.5.1. Pribor i instrumenti za protočnu citometriju.....	28
3.5.2. Pribor i instrumenti za QuantiFERON-TB Gold In Tube test.....	29
3.6. RAČUNALNI PROGRAMI ZA ANALIZU.....	29
3.7. METODE.....	29
3.7.1. Priprema uzoraka za protočnu citometriju.....	29
3.7.2. Priprema uzoraka za QuantiFERON-TB Gold In Tube test.....	30
3.7.3. Izvođenje enzimskog imunotesta (ELISA).....	30

<b>4. REZULTATI</b> .....	33
4.1. ODREĐIVANJE APSOLUTNOG BROJA CD4 <sup>+</sup> LIMFOCITA T.....	34
4.2. ANALIZA REZULTATA KVANTIFERONSKOG TESTA.....	35
4.3. REZULTATI KVANTIFERONSKOG TESTA U HIV-OM ZARAŽENIH ISPITANIKA OBZIROM NA IMUNOSNI STATUS .....	36
4.4. PARAMETRI CD4 <sup>+</sup> LIMFOCITA T KOD HIV-OM ZARAŽENIH ISPITANIKA IZ PROUČAVANE SKUPINE UZORAKA.....	38
4.4.1. Apsolutni broj CD4 <sup>+</sup> limfocita T.....	38
4.4.2. Omjer postotaka CD4 <sup>+</sup> i CD8 <sup>+</sup> limfocita T.....	39
<b>5. RASPRAVA</b> .....	41
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	46
<b>7. LITERATURA</b> .....	48

## **POPIS KRATICA:**

BCG (cjepivo)	Bacillus Calmette Guérin
CD (limfociti T)	engl. cluster of differentiation protein (koreceptor na limfocitima T)
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
HIV	virus ljudske imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus)
HLA-DR	ljudski leukocitni antigen DR (engl. human leukocyte antigen DR)
IGRA	engl. interferon gamma release assay
IFN- $\gamma$	interferon gama
PPD	purificirani proteinski derivat
SIDA	sindrom stečene imunodeficijencije (fra. syndrome d'immunodéficience acquise)
TB	tuberkuloza
TNF	faktor tumorske nekroze (engl. tumor necrosis factor)





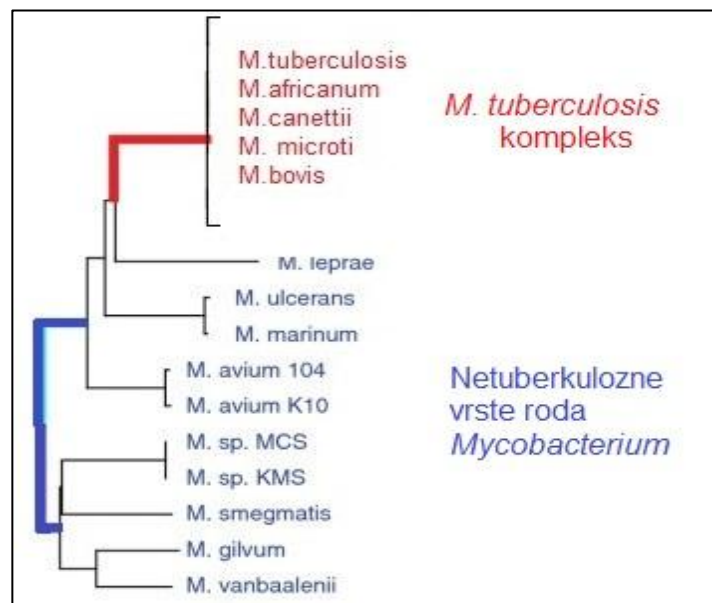
## 1.1 MYCOBYCTERIUM TUBERCULOSIS

*Mycobacterium tuberculosis* patogena je bakterija koja uzrokuje tuberkulozu u čovjeka. Otkrivena je 1882. god. zahvaljujući radu znanstvenika Roberta Kocha (Daniel 2006), te je poznata i kao Kochov bacil. Pripada bakterijskom redu *Actinomycetales*, porodici *Mycobacteriaceae*, rodu *Mycobacterium* (Tablica 1).

Tablica 1. Znanstvena klasifikacija bakterije *Mycobacterium tuberculosis*.

<b>CARSTVO</b>	<i>Bacteria</i>
<b>KOLJENO</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>RAZRED</b>	<i>Actinobacteria</i>
<b>RED</b>	<i>Actinomycetales</i>
<b>PODRED</b>	<i>Corynebacterineae</i>
<b>PORODICA</b>	<i>Mycobacteriaceae</i>
<b>ROD</b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>VRSTA</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Rod *Mycobacterium* obuhvaća dvije skupine bakterija: članove kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* (koje uzrokuju tuberkulozu u čovjeka i/ili životinja) i netuberkulozne vrste bakterija (Slika 1).



Slika 1. Podjela bakterija unutar roda *Mycobacterium*. Crvena boja naznačava članove kompleksa *M. tuberculosis*, dok su plavom bojom naznačene netuberkulozne bakterije.

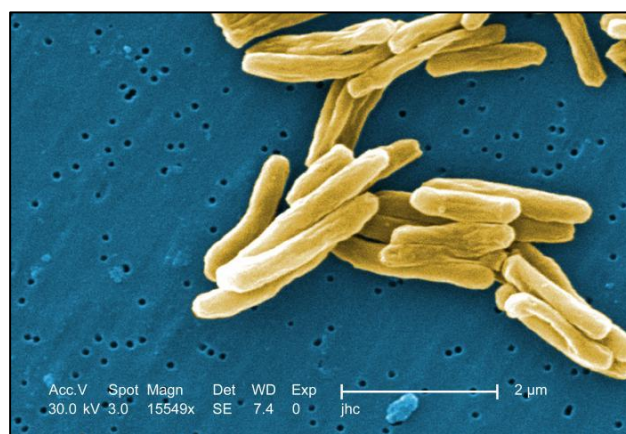
## UVOD

---

Klasifikacija u ove dvije skupine vrši se na temelju generacijskog vremena, tipova katalaza, produkcije niacina te pigmentacije bakterijskih kolonija na svjetlu odnosno u tami (Baron 1996). Kompleks *Mycobacterium tuberculosis* tako okuplja genetički vrlo srodne vrste roda *Mycobacterium* koje uzrokuju tuberkulozu (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium microti* i *Mycobacterium bovis*). Nukleotidni slijed svih pripadnika kompleksa je identičan u 99,9% parova baza. Razlike među njima rezultat su postojanja rijetkih različitosti u vidu sSNP (engl. synonymous single nucleotide polymorphism) (Brosch i sur. 2002).

Zajednički predak današnjih članova kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* pojavio se na području istočne Afrike u razdoblju prije 35 000 do 15 000 godina, a evoluirao je iz bakterija tla. Daljnja evolucija omogućila je zarazu sisavaca, te je s pripitomljavanjem stoke, prije otprilike 10 000 do 25 000 godina, što je patogenu omogućilo prijelaz na čovjeka, i daljnju evoluciju prema *Mycobacterium tuberculosis*, koja se javlja prije otprilike 4000 godina. Čitav niz različitih, danas prisutnih, sojeva *Mycobacterium tuberculosis* evoluirao je u proteklih 250 do 1000 godina (Brosch i sur. 2002; Smith 2003; Daniel 2006). Soj *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv izoliran je 1905. godine i od tada nalazi široku primjenu u brojnim istraživanjima (Cole i sur. 1998).

*Mycobacterium tuberculosis* je Gram-pozitivna, štapičasta bakterija (Slika 2), dužine 2-4  $\mu\text{m}$  i širine 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ . Svrstana je u Gram-pozitivne bakterije zbog nedostatka vanjske stanične membrane, iako zbog visokog sadržaja lipida u bakterijskoj staničnoj stijenci klasično bojanje po Gramu ne rezultira tipičnim obojenjem.



**Slika 2.** *Mycobacterium tuberculosis*, slika je nastala pomoću elektronskog skenirajućeg mikroskopa, povećanje 15549 puta. Preuzeto s [www.textbookofbacteriology.com](http://www.textbookofbacteriology.com)

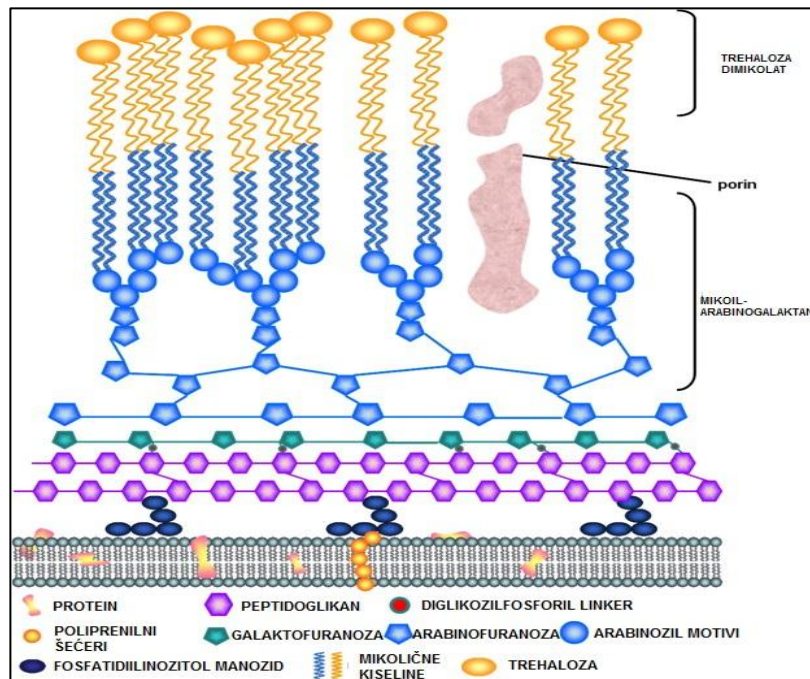
## UVOD

Ovaj bacil nema mogućnost aktivnog pokretanja. Obligatni je aerob, te fakultativni unutarstanični parazit, koji preferencijalno inficira makrofage. Generacijsko vrijeme, u idealnim uvjetima, iznosi od 18 do 24 sata. Pojedinačne bakterije se povezuju u vijugave vrpce, te oblikuju male, bezbojne kolonije hrapave površine (Slika 3) (Baron 1996; Cole i sur. 1998).



Slika 3. Kolonije bakterije *Mycobacterium tuberculosis*. Preuzeto sa stranice [www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org).

Jedna od najznačajnijih karakteristika koja je ključna za fiziologiju same bakterije kao i za izazivanje bolesti, jest stanična stijenka jedinstvene građe u svijetu prokariota (Slika 4).

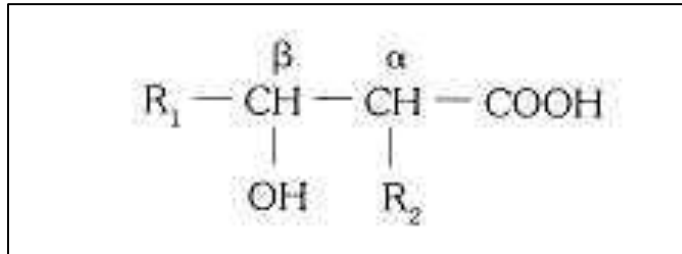


Slika 4. Shematski prikaz stanične stijenke *Mycobacterium tuberculosis*, s naznačenim ključnim dijelovima. Prilagođeno iz McLean i sur. 2007.

## UVOD

---

Uz sloj peptidoglikana (muramina), stijenka posjeduje dodatne slojeve. Dugolančane masne kiseline, poput mikoličnih kiselina (Slika 5), koje broje između 60 i 90 C-atoma, povezane su fosfodieterskim vezama sa slojem peptidoglikana.



**Slika 5. Opća formula mikolične kiseline.**

Sloj arabinogalaktana je na mikoličnu kiselinu vezan esterificiranom glikolipidnom vezom. U sklopu bakterijske stijenke moguće je pronaći i druge rijetke lipidne spojeve poput trehaloze dimikolata (tzv. Cord faktora) ili kompleksnih voskova kao što je WaxD. Udio lipida u stijenci je viši od 60%, što rezultira sljedećim obilježjima bakterijske stanice *Mycobacterium tuberculosis* (Baron 1996; Cole i sur. 1996; Kolattukudy i sur. 1997):

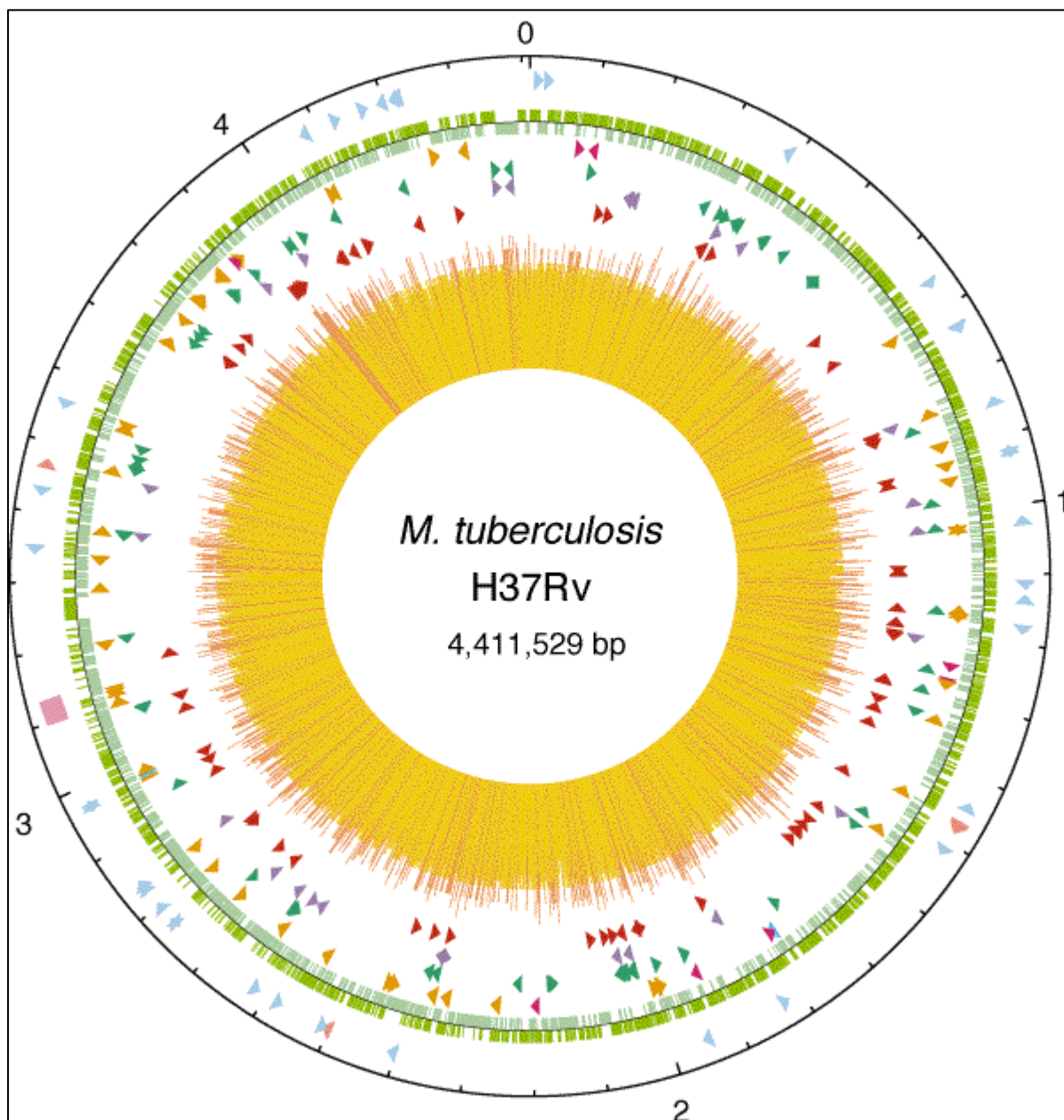
- Nepropusnost stanične stijenke za boje
- Otpornost na antibiotike
- Otpornost na kiseline i lužine, te dehidraciju
- Otpornost na osmolizu
- Otpornost na oksidaciju i mogućnost preživljavanja u makrofagima.

Genom bakterije *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Slika 6) broji  $4,4 \times 10^6$  parova baza, pri čemu 65,6% ukupnog broja čine bazni parovi gvanin-citozin. Kodira otprilike 4000 gena. Dvjestotinjak njih (odnosno 6% ukupnih gena) kodira enzime uključene u metabolizam masnih kiselina, pri čemu je polovica njih uključena u  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina. Ovi enzimi omogućuju korištenje lipida domaćina kao izvora ugljika prilikom infekcije. U genomu nalazimo i dvije genske porodice kiselih, glicin-bogatih proteina, koji broje između 110 i 180 aminokiselina: PE i PPE porodicu. Porodica PE broji 104 gena. Kodira proteine na čijem se N-kraju nalazi konzervirana sekvenca Pro-Glu. Porodica PPE broji 68 proteina, s konzerviranom Pro-Pro-Glu sekvencom na N-kraju proteina. Obje genske porodice čine 4% ukupnih gena, te kodiraju proteine nepoznatih funkcija, od kojih su neki pronađeni u sastavu stanične stijenke odnosno stanične membrane.



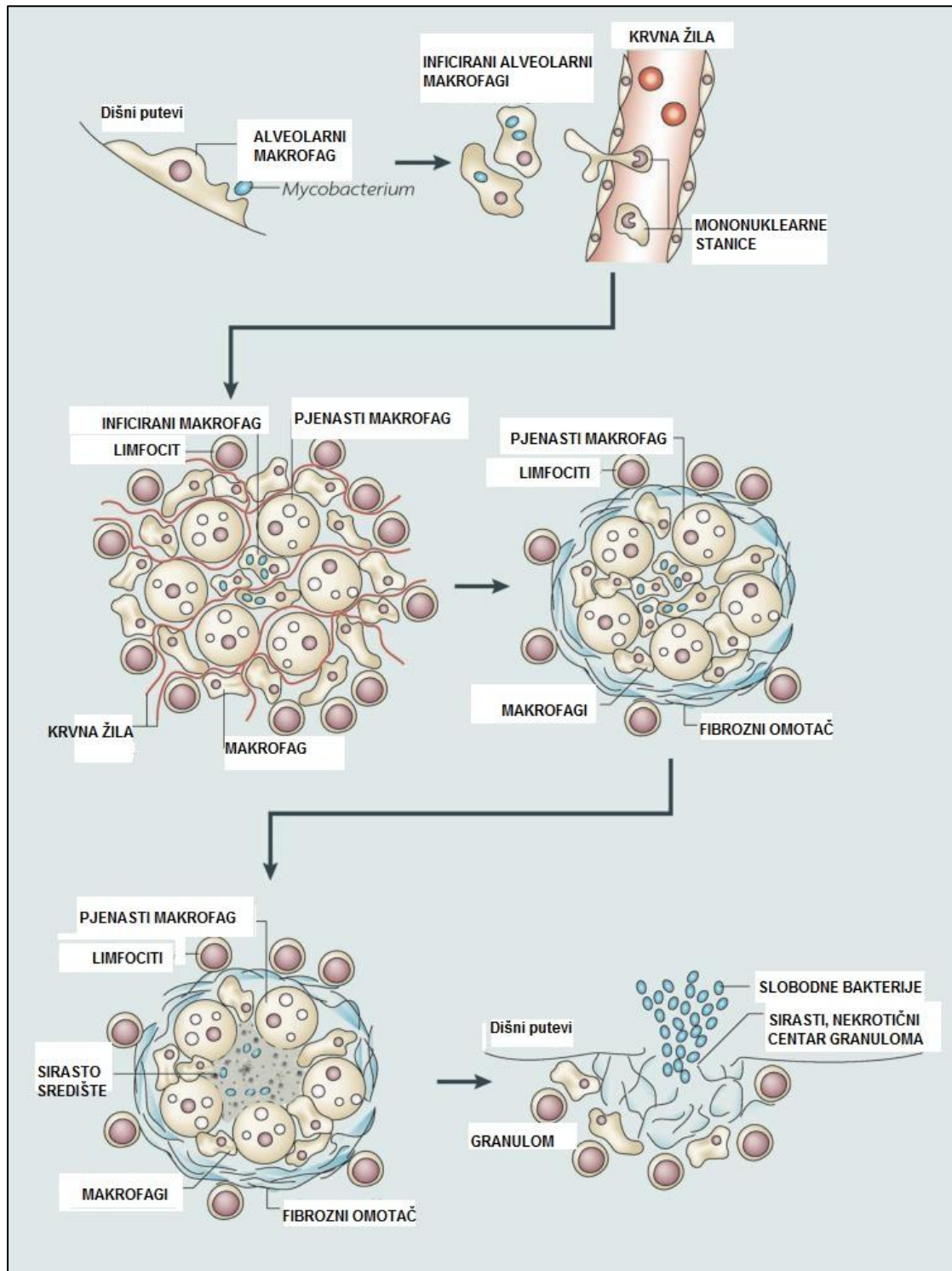
## UVOD

Od preostalih gena, 110 njih (ili 0,3% ukupnih gena) kodira sigma transkripcijske faktore, 22 gena (0,6%) kodira regulatorne proteine, a 125 gena (3%) kodiraju proteine uključene u različite oblike transporta unutar stanice (Smith 2003).



Slika 6. Cirkularna mapa genoma *M. tuberculosis* H37Rv. Mjesto početka replikacije označeno je slovom O. Položaj članova PPE porodice naznačen je zelenim strelicama, purpurne strelice označavaju gene iz porodice PE. Slika je nastala uz pomoć programa DNASTAR. Preuzeto od Smith 2003.

1.2 RAZVOJ TUBERKULOZE I IMUNOSNI ODGOVOR DOMAĆINA

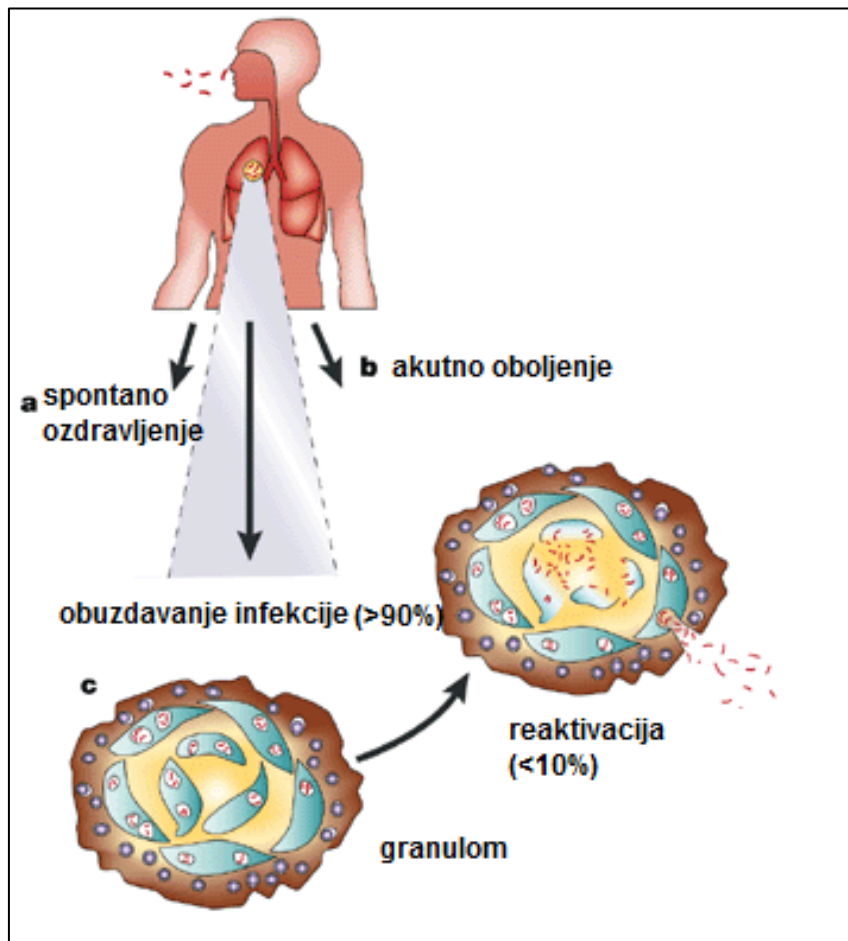


Slika 7. Životni ciklus *Mycobacterium tuberculosis*. Prilagođeno od Russell i sur. 2009.

## UVOD

Do infekcije dolazi udisanjem zraka u kojem se nalaze bakterije uklopljene u kapljice. Nakon ulaska zraka u pluća, bakterije inficiraju alveolarne makrofage, pneumocite tipa II te dendritične stanice (Smith 2003). Nekoliko je mogućih scenarija razvoja bolesti (Slika 8) (Schluger 2005):

- potpuna eliminacija bakterija bez razvoja simptoma;
- ograničavanje infekcije na područje granuloma, kroz duži vremenski period (latentna tuberkuloza)
- neposredan razvoj bolesti s pripadajućim simptomima kao rezultat narušenog imuniteta.



Slika 8. Mogući ishodi infekcije *Mycobacterium tuberculosis*. Prilagođeno od Kauffman (2001).

Napredovanje tuberkuloze ili njezino stavljanje u latentno stanje ovisi o jačini i tipu imunskog odgovora, u koji su uključeni makrofagi, limfociti T i dendritičke stanice (Condos i sur.1998; Smith 2003).

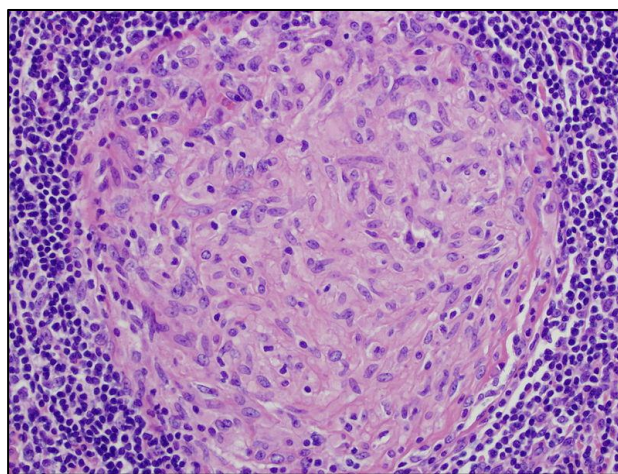


## UVOD

---

Alveolarni makrofagi su primarne stanice uključene u imunološki odgovor na infekciju *Mycobacterium tuberculosis*. Makrofagi na sebi nose manozne i druge receptore (poput TLR2 i TLR4). Vezanjem antigena *Mycobacterium tuberculosis* na receptore, aktiviraju se fagociti koji počinju s fagocitiranjem bakterija, te produciraju kemokine zadužene za privlačenje neaktiviranih monocita, limfocita i neutrofila na mjesto infekcije. Unutar makrofaga, bakterijske stanice pohranjene su u fagosomima. Fuzijom fagosoma s lizosomima i nastankom fagolizosoma omogućuje se razaranje bakterijskih stanica. Za proces lize i antimikrobno djelovanje ključni su reaktivni oblici dušika (RNS, engl. reactive nitrogen species), odnosno reaktivni oblici kisika (ROS, engl. reactive oxygen species), spojevi inače pohranjeni u lizosomima. Kao vlastitu obranu i otpornost na makrofage, *Mycobacterium tuberculosis* razvile su strategiju inhibicije stvaranja fagolizosoma, čiji moguć mehanizam inhibicije uključuje inaktivaciju signalizacije putem  $Ca^{2+}$  iona. Kalcijevi ioni sudjeluju u stimulaciji brojnih upalnih odgovora, poput sinteze dušikovog oksida ili sinteze citokina, ali imaju i ključnu ulogu u stvaranju fagolizosoma (Smith 2003; Schluger 2005; Russel i sur. 2009).

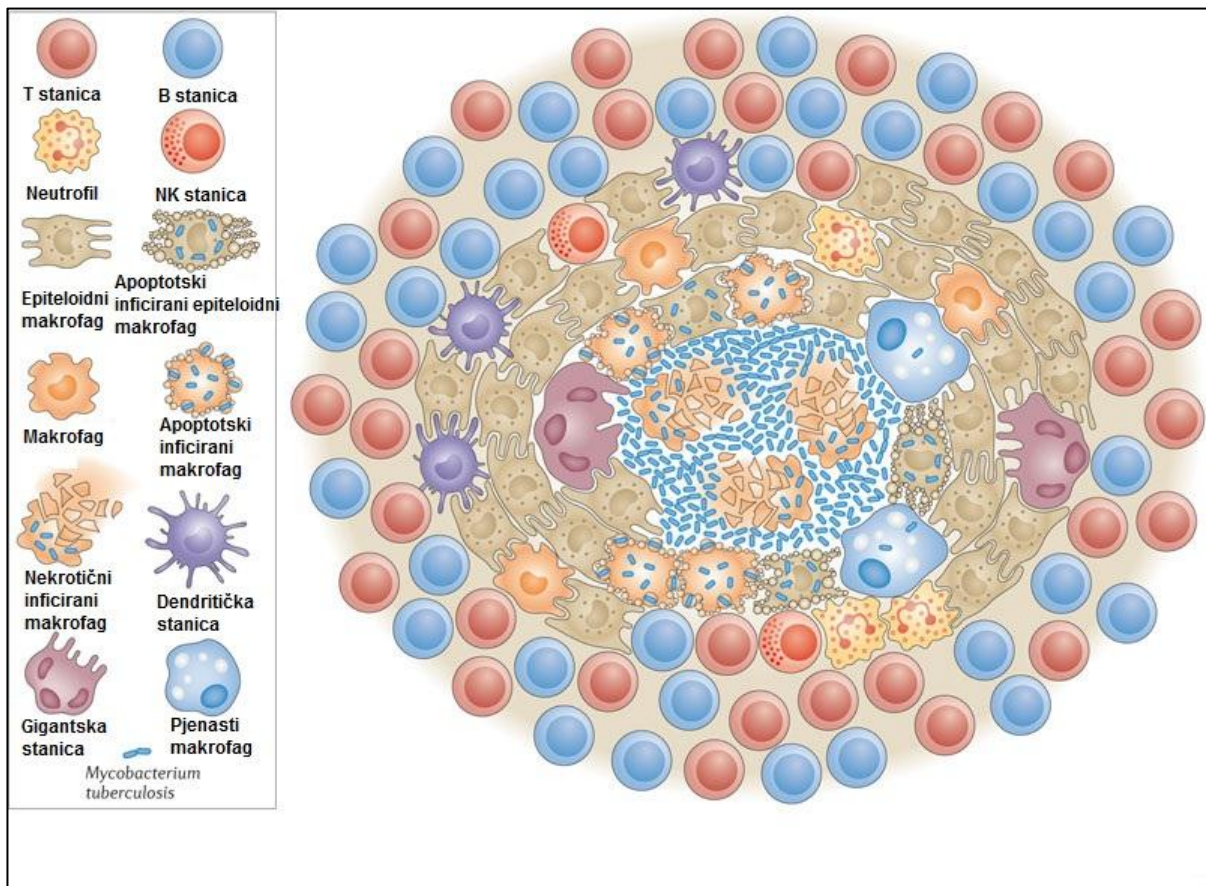
Dendritičke stanice inficirane bakterijom mnogo su učinkovitije u predočavanju prerađenih antigena limfocitima T no što je to slučaj s makrofagima. Akumulacijom ovih stanica u regionalnom limfnom čvoru potiče se aktivacija poglavito  $CD4^{+}$  limfocita T. Limfociti T stimuliraju efektorske funkcije makrofaga te sudjeluju u stvaranju granuloma (Slika 9).



**Slika 9.** Granulom u limfnom čvoru pacijenta inficiranog *Mycobacterium tuberculosis*. Tkivo je obojano bojama hematoksilin (plavo) i eozin (crveno). Preuzeto sa stranice <http://collarboneremains.wordpress.com/>.

## UVOD

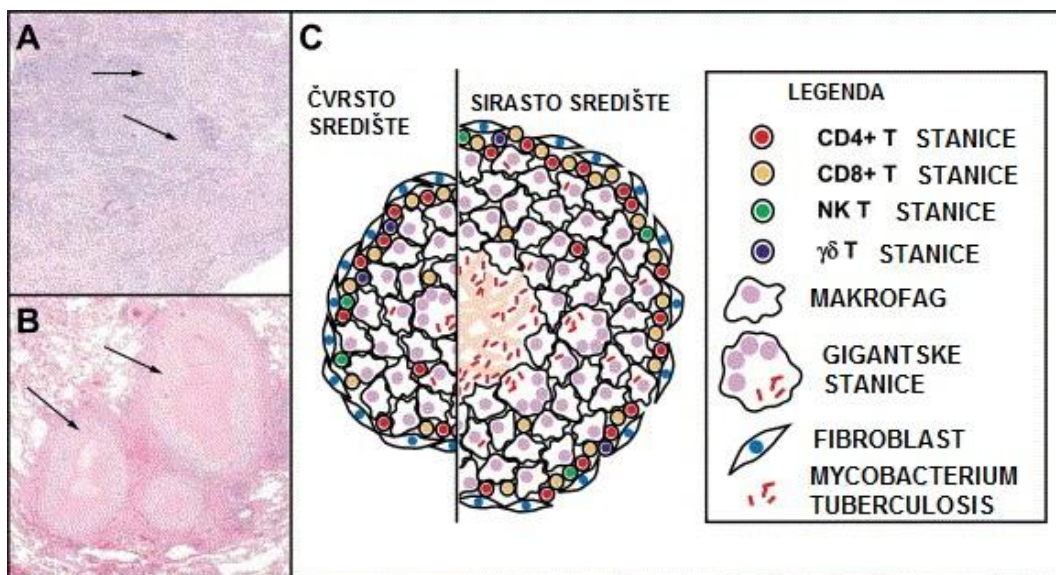
Analiza populacije  $CD4^+$  limfocita T kod pacijenata oboljelih od tuberkuloze pokazala je postojanje dviju fenotipski različitih subpopulacija limfocita:  $T_H1$  i  $T_H2$ . Dvije subpopulacije luče različite citokine: interferon  $\gamma$  tipičan je za subpopulaciju  $T_H1$ , dok subpopulacija  $T_H2$  primarno luči citokine interleukin-4 (IL-4), interleukin-5 (IL-5) i interleukin-10 (IL-10). Klinička manifestacija bolesti uvelike je ovisna o subpopulaciji limfocita T prisutnih na mjestu infekcije. Kod pacijenata s uznapredovalim, nekrotičnim lezijama uglavnom je detektirana  $T_H2$  subpopulacija  $CD4^+$  limfocita T, dok je u pacijenata s ograničenim lezijama dominirala  $T_H1$  subpopulacija  $CD4^+$  limfocita T (Condos i sur. 1998; Schluger 2005).



Slika 10. Shematski prikaz granuloma. Stanice koje sudjeluju u izgradnji granuloma označene su u legendi na lijevoj strani slike. Preuzeto i prevedeno od Ramakrishnan 2012.

U slučajevima latentne tuberkuloze, imunološki sustav uspijeva ograničiti i stabilizirati bakterijski rast, dovodeći do stvaranja granuloma (Slika 10). Vrlo je vjerojatno da se bakterije ne umnožavaju zbog nepovoljnih uvjeta koji su im nametnuti uslijed imunološkog odgovora,

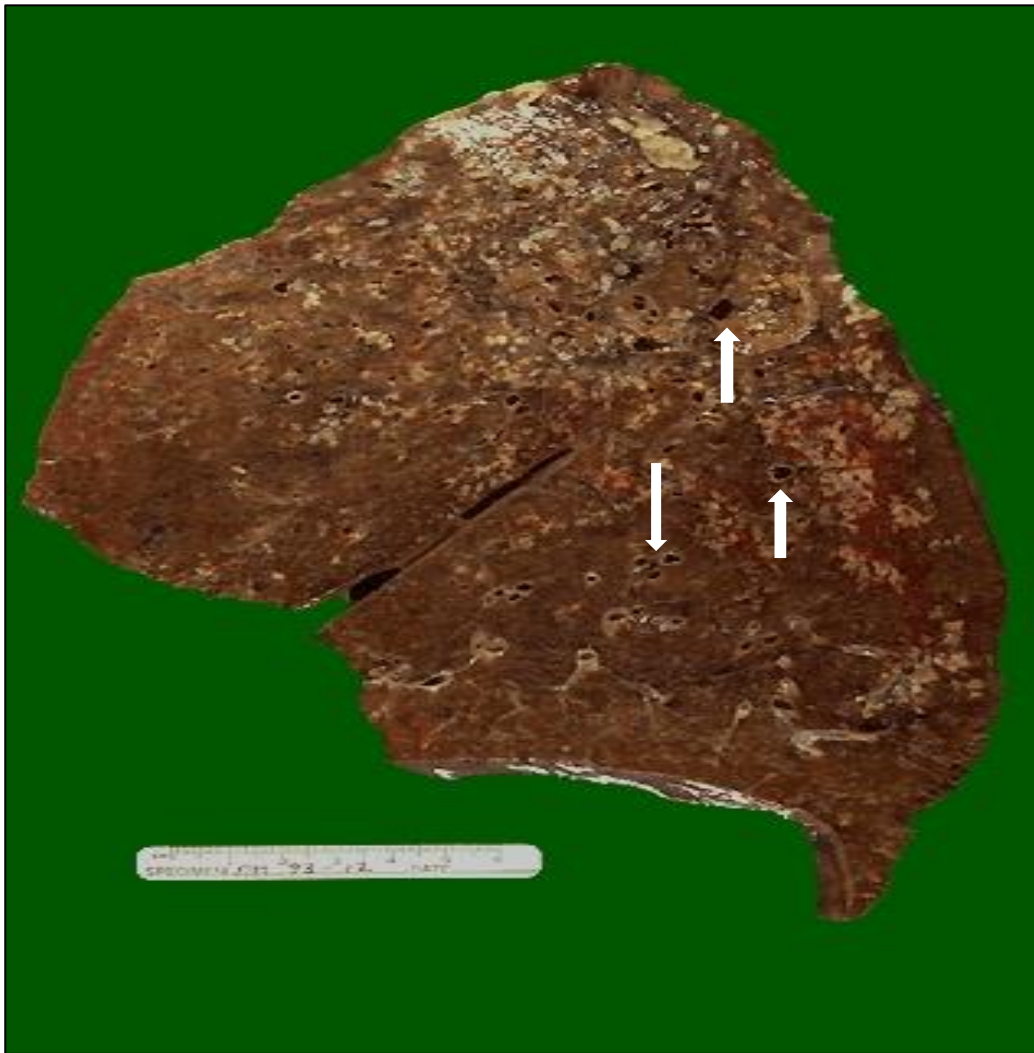
pri čemu stanice imunološkog sustava neće direktno regulirati njihovu brojnost (Russel i sur. 2009). Nastanku granuloma prethodi stvaranje granulomatozne fokalne regije, koju oforme gigantske, multijezgrene stanice (nastale daljnjim razvojem aktiviranih makrofaga) i limfociti. Oko ove regije nastaje fibrozna kapsula, pri čemu unutar fibrozne kapsule ostaju makrofagi dok su većina limfocita T potisnuti van kapsule (Slika 11). Stvaranje granuloma potiče TNF (engl. tumor necrosis factor) kojeg luče i makrofagi i limfociti T. Nastali granulom podliježe mineralizaciji (Slika 12), te omogućava lokalizaciju infekcije koja se održava u stabilnom, balansiranom stanju (Smith 2003; Russel i sur. 2009).



**Slika 11. Granulomi *Mycobacterium tuberculosis*. (A) s čvrstim središtem, mikroskopski prikaz (B) sa sirastim (kazeoznim) središtem, mikroskopski prikaz (C) usporedba strukture čvrstog i sirastog središta, shematski prikaz. Prilagođeno od Co i sur. (2004).**

Latentna infekcija tuberkulozom može prerasti u aktivnu, prilikom čega centar granuloma postaje kazeozni (sirast), nakon čega dolazi do nekroze tkiva u centru granuloma, a što u konačnici rezultira kolapsom granuloma. Ispuštene bakterije imaju daljnju mogućnost širenja kroz pluća, a limfom krvlju i u druge organe domaćina. Izdisajem oslobođene bakterije bivaju otpuštene u okolinu (Smith 2003).





Slika 12. Pluća inficirana bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*. Vidljiva su područja s brojnim granulomima (neki od granuloma označeni su strelicom). Nekoliko većih granuloma posjeduju sirasti centar. Preuzeto sa stranice <http://iris.nyit.edu/>.

### 1.3 ZDRAVSTVENO ZNAČENJE I RAŠIRENOST TUBERKULOZE

Otpriblike jedna trećina svjetske populacije zaražena je bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*, pri čemu su najčešće latentne infekcije. Rizik za razvoj bolesti u tih osoba prisutan je čitavog života, a vjerojatnost za razvoj tuberkuloze procjenjuje se na 10%. Vjerojatnost razvoja bolesti značajno raste u pušača i osoba s oslabljenim imunološkim sustavom.

Tuberkuloza je bolest koja se javlja u čitavom svijetu. U pojedinim zemljama zabilježen je oštar pad u broju oboljelih u posljednjih 20 godina (primjerice u Brazilu, Kini, Kambodži). Ipak, u pojedinim regijama svijeta vjerojatnost zaraze i dalje je vrlo visoka. Tijekom 2011. godine 8,7 milijuna ljudi oboljelo je od tuberkuloze, pri čemu je njih 1,4 milijuna umrlo. Najviše novooboljelih zabilježeno je na području Azije (60% ukupnog broja oboljelih), a 80% svih oboljelih dolazi iz 22 države svijeta. Većina umrlih (95%) potječe iz zemalja s niskim ili srednje visokim primanjima i na trećem je mjestu uzročnika smrtnosti žena između 15 i 44 godina života.

U svom radu Schluger (2005) navodi da su pojedine populacije značajnije sklone razvoju tuberkuloze (Inuiti u Sjevernoj Americi, Yanomami Indijanci u brazilskoj Amazoniji, Afroamerikanci u SAD-u). Schluger, nadalje, smatra da su pojedine populacije razvile prirodenu imunost, kao što je slučaj s Europljanima u kojih je selekcijski pritisak prilikom ranih infekcija *Mycobacterium tuberculosis* doveo do razvoja rezistentnosti. Za otpornost je vjerojatno odgovoran gen *nramp1* (engl. natural resistance-associated macrophage protein), danas označen kao *nrmp1* gen. U ljudi genski lokus *nrmp1* gena smješten je na 2q35 i kodira transmembranski ionski nosač na fagosomima makrofaga. U populaciji je poznato nekoliko polimorfizama ovog gena, koji su u direktnoj vezi s otpornošću na tuberkulozu (Schluger 2005).

### 1.4 TUBERKULOZA I HIV

U HIV pozitivnih osoba koje su ujedno zaražene bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* vjerojatnost prelaska latentnog oblika tuberkuloze u aktivni oblik bolesti veća je od 50%. Nadalje, smrtnost uvjetovana tuberkulozom četiri je puta veća u pacijenata koji su

ujedno i HIV pozitivni. Čak 44% svih smrti povezanih s SIDA-om na godišnjoj razini uvjetovane su simultanim oboljenjem od tuberkuloze (Nyamogoba i sur. 2012). Ekstrapulmonarna tuberkuloza češća je u osoba koje su zaražene HIV-om.

Ovisno o tome jesu li osobe zaražene *Mycobacterium tuberculosis* ujedno zaražene i HIV-om ili ne, razlikuju se profili stanica imunološkog sustava koje su uključene u odgovor na infekciju *Mycobacterium tuberculosis* kao i profili citokina koje te stanice luče (Aljohaney i sur. 2012). HIV narušava sposobnost organizma domaćina da kontrolira infekciju bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*. Pri tome valja razlučiti primarne infekcije od latentnih infekcija: mehanizmi kojima organizam kontrolira ova dva vida infekcije jesu različiti, te su shodno tome različite strategije utjecaja HIV-a na njih.

Danas je postavljeno više hipoteza koje nastoje objasniti način na koji HIV povećava rizik oboljenja od tuberkuloze u slučajevima latentne infekcije. Mnoge od njih naglašavaju utjecaj virusa na lokalni imunološki odgovor u granulomu. U daljnjem tekstu navedena su četiri mehanizma aktivacije HIV-om koji moguće dovode do štetnih funkcionalnih promjena u granulomu (Deidrich i Flynn 2011):

### ➤ **PORAST TITRA HIV-A U TKIVU**

Do povećanja broja virusnih čestica dovodi pojačana replikacija virusa na mjestu infekcije *Mycobacterium tuberculosis*. Uzrok tome leži u činjenici da HIV preferira aktivirane CD4<sup>+</sup> limfocite T i aktivirane (CD14<sup>+</sup>) makrofage kao mjesto replikacije. *Mycobacterium tuberculosis* pojačava replikaciju HIV-a jer infekcija potiče lučenje upalnih citokina (IL-6 i INF- $\gamma$ ), a oni aktiviraju limfocite T i makrofage.

### ➤ **SMANJENJE BROJA CD4<sup>+</sup> LIMFOCITA T U GRANULOMU**

Istraživanja su pokazala da je broj CD4<sup>+</sup> limfocita T (aktiviranih i memorijskih stanica) značajno smanjen u perifernim i mukoznim tkivima te tkivu crijeva po infekciji HIV-om. U tkivu crijeva je tako 60% CD4<sup>+</sup> stanica uništeno deset dana nakon infekcije HIV-om, dok je 80% populacije stanica uništeno nakon dva tjedna po infekciji. Postoji mogućnost da se isto događa i u granulomu. Zbog značajnog smanjenja broja stanica ključnih u obrani od *Mycobacterium tuberculosis*, imunološko obuzdavanje infekcije je otežano te se latentna infekcija promovira u aktivnu.

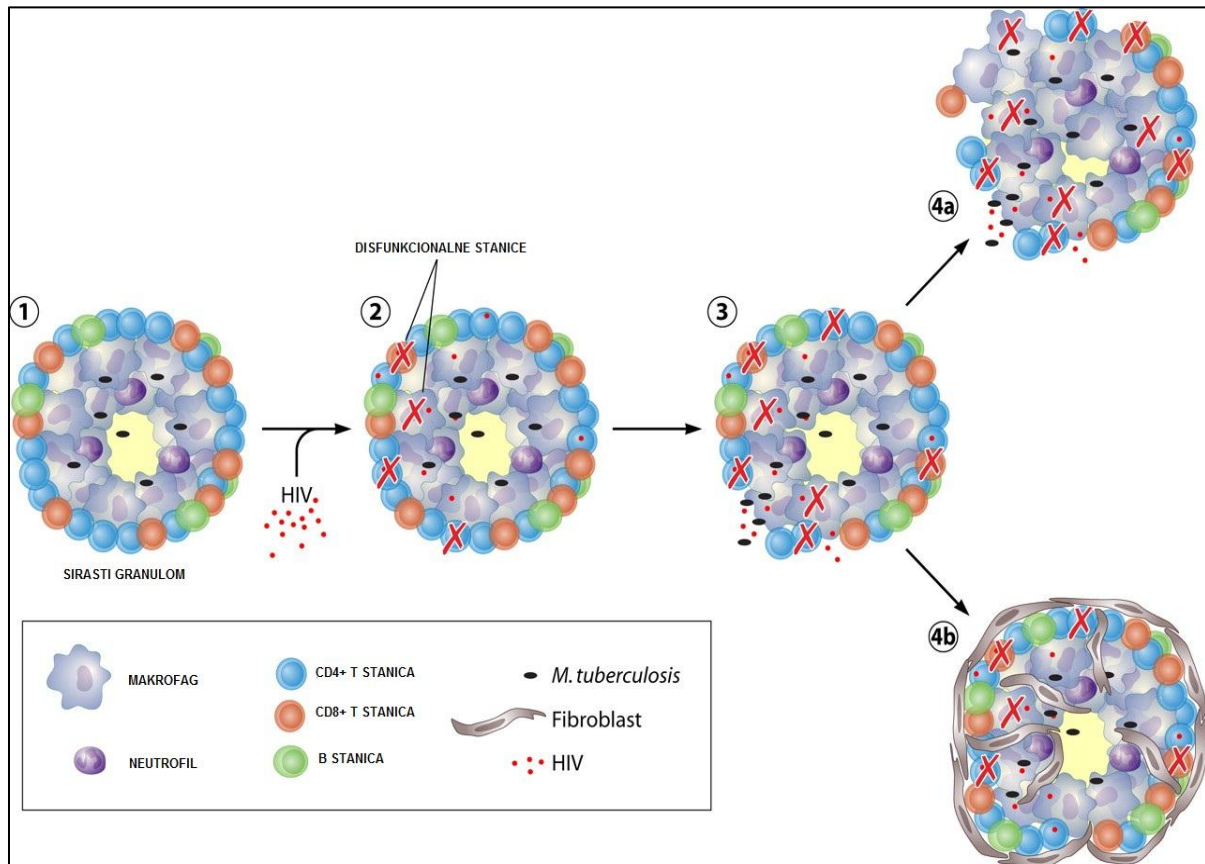
### ➤ **NARUŠENA FUNKCIJA MAKROFAGA**

HIV preferira aktivirane (HLA-DR<sup>+</sup>) alveolarne makrofage (CD14<sup>+</sup> CD36<sup>+</sup>). Makrofagi tako postaju stanice koje su istovremeno rezervoar za HIV i *Mycobacterium tuberculosis*. Dvije su strategije koju makrofagi primjenjuju u borbi protiv *Mycobacterium tuberculosis*: uništenje bakterija stvaranjem fagolizosoma ili apoptozom samog makrofaga. Apoptoza makrofaga je strategija koja nije uvijek dobar izbor za domaćina s obzirom da postoji realna mogućnost preživljavanja određenog broja patogena i posljedično njihovog daljnjeg širenja organizmom. Postoje dokazi koji upućuju na pojačanu apoptozu alveolarnih makrofaga u pacijenata koji boluju od SIDA-e i tuberkuloze u odnosu na oboljele isključivo od plućne tuberkuloze (Placido i sur. 1997). Osim na apoptozu, HIV utječe i na sposobnost makrofaga za zakiseljavanje fagosoma, odnosno stvaranje fagolizosoma.

### ➤ **PROMJENA FUNKCIJA LIMFOCITA T TIPIČNIH ZA INFEKCIJU *M. TUBERCULOSIS***

Prilikom infekcije *Mycobacterium tuberculosis* limfociti T luče citokine (INF- $\gamma$ , IL-2, TNF) i različite citolitične molekule. Osim što HIV smanjuje broj CD4<sup>+</sup> limfocita T u granulomu, on utječe i na tip i količinu izlučenih citokina odnosno citolitičkih molekula (Beznidenhout i sur. 2009).

Slika 13. ilustrira navedene mehanizme kojim HIV promovira latentnu infekciju *Mycobacterium tuberculosis* u aktivnu. Vjerojatnost jest da se ti mehanizmi međusobno preklapaju i sinergijski dovode do povećane mogućnosti razvoja tuberkuloze u pacijenata zaraženih HIV-om (Deidrich i Flynn 2011).



**Slika 13. Pretpostavljeni mehanizam HIV-inducirane reaktivacije latentne tuberkuloze. 1. Nekrotični granulom u osobe s latentnom tuberkulozom. 2. HIV ulazi u granulom i izaziva funkcionalne promjene u T-limfocitima i makrofagima. 3. Smanjenje broja T-stanica i povećanje disfunkcionalnosti stanica dovodi do propadanja granuloma. 4a. Propadanje granuloma i oslobađanje *M.tuberculosis* dovodi do rane reaktivacije tuberkuloze. 4b. Fibrozni omotač privremeno uspostavlja integritet granuloma i sprečava širenje infekcije. Preuzeto i prevedeno od Deidrich i Flynn (2011).**

Kod imunokompromitiranih bolesnika, za razliku od imunokompetentnih osoba, češće se javlja izvanplućna tuberkuloza, koju je ujedno i teže dijagnosticirati. Tako je česta tuberkuloza limfnih čvorova, središnjeg živčanog sustava, koštano-zglobnog sustava, spolno-mokraćnog sustava i crijeva (Majić Milotić i sur. 2011).



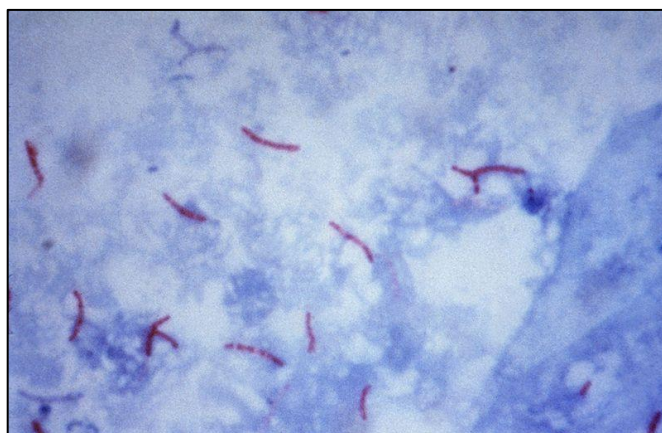
### 1.5 DIJAGNOSTIKA TUBERKULOZE

U dijagnostici tuberkuloze primjenjuju se različite metode kojima se nastoji dokazati prisutstvo *Mycobacterium tuberculosis* u kliničkim biološkim uzorcima dobivenim od pacijenata, što predstavlja zlatni standard u dijagnostici aktivne tuberkuloze. Mikrobiološke i radiološke metode te imunološki testovi pouzdani su alati u otkrivanju uzročnika tuberkuloze.

#### MIKROBIOLOŠKE METODE U DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE

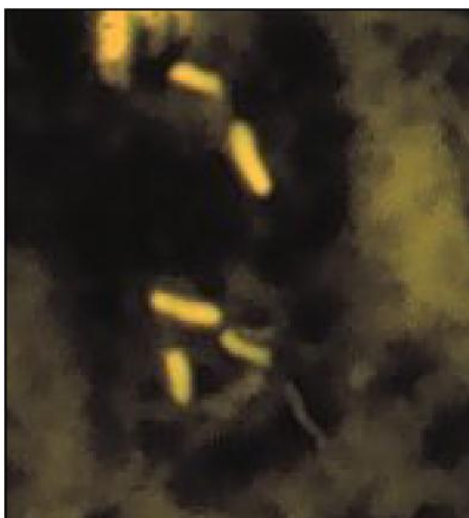
Mikrobiološke metode dijagnosticiranja podrazumijevaju dokazivanje *Mycobacterium tuberculosis* u sputumu (iskašljaju), mukoznom sekretu iskašljanom iz donjih dišnih puteva. Sputum se koristi za razmaz ili uzgoj bakterijskih kultura.

Bakterije roda *Mycobacterium* imaju specifično građenu staničnu stijenku, bogatu lipidima velike molekularne mase, koja nije pogodna za bojanje reagensima na bazi vode tipičnim za bojanje po Gramu (Cole i sur. 1998). Iz tog razloga za potvrđivanje prisutnosti ove skupine bakterija primjenjuje se Ziehl–Neelsen bojanje (Acid-fast bojanje). Reagensi koji se primjenjuju u ovoj metodi obuhvaćaju karbol-fuksin, kiselinski alkohol (npr. 3% HCl-etanol) za odbojavanje i metilensko modriilo za pozadinsko bojanje. Bojanje karbolfuksinom prikazuje acidorezistentne mikroorganizme kao crvene štapiće na plavoj pozadini (ako je kontrastna boja metilensko modriilo), kao što je prikazano na Slici 14. (Ellis i Zabrowarny 1993). Otkrivanje obojenih bakterija vrši se uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa.



Slika 14. *Mycobacterium tuberculosis*, bojanje po Ziehl-Neelsen metodi. Crvenom bojom obojane su bakterijske stanice. Preuzeto sa <http://lgcpublishing.com/pop01.html>.

Auramin-rodamin bojanje metoda je koja je manje specifična, no njena osjetljivost je veća te se često primjenjuje u otkrivanju uzročnika tuberkuloze. Reagens sadrži mješavinu boja auramin O i rodamin B. Bakterije roda *Mycobacterium* fluoresciraju crveno do žuto (Slika 15) (Abe 2003).



**Slika 15. Auramin-rodamin bojanje *Mycobacterium tuberculosis*. Preuzeto od Aubry (2012.).**

Konačnu potvrdu infekcije bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*, bez obzira na inicijalno pozitivan ili negativan test bojanja sputuma, moguće je osigurati uz pomoć PCR metode (lančane reakcije polimerazom); metodom DNA-DNA hibridizacije koja nudi mogućnost razlikovanja 22 različite vrste roda *Mycobacterium*; metodom plinske/tekućinske kromatografije ili tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) koje otkrivaju karakterističnu građu stanične stijenke i raspored mikolične kiseline u njoj (Abe 2003).

### IMUNOLOŠKE METODE U DIJAGNOSTICI TUBERKULOZE

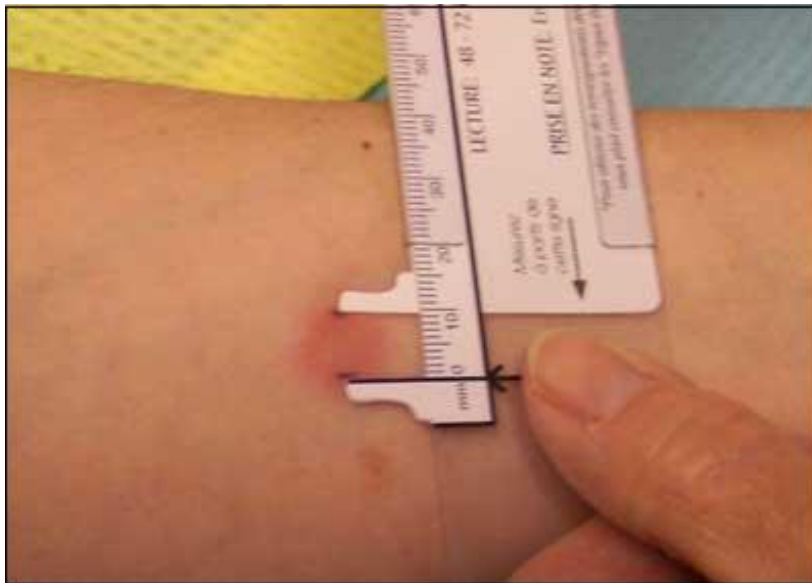
Imunološki testovi koji se danas uobičajno koriste u dijagnostici, kako latentne tako i aktivne tuberkuloze, jesu klasični kožni test (tuberkulinski PPD-test) i krvni testovi – IGRA-testovi (engl. Interferon Gamma Release Assay).

**Tuberkulinski (PPD, purificirani proteinski derivat) test** razvijen je u 19. stoljeću, a u kliničkoj medicini koristi se i danas. Prvi je tuberkulinski test izveo Robert Koch, dok ga je u kliničku primjenu za otkrivanje infekcije tuberkulozom uveo 1907. godine uveo von

## UVOD

---

Pirquet (Majić Milotić i sur. 2011). Ovaj test in vivo temeljen je na odgođenoj hipersenzitivnoj reakciji u osoba koje su inficirane bakterijom *Mycobacterium tuberculosis*, a do koje dolazi po izlaganju tuberkulinu. Tuberkulin je grubi antigenski preparat koji je moguće izolirati i purificirati iz bakterijske kulture *Mycobacterium tuberculosis*, nakon izlaganja visokoj temperaturi koja ubija same bakterije. Tuberkulin jest smjesa proteina, polipeptida, nukleinskih kiselina i značajne količine polisaharida. Kao antigen često je u primjeni PPD (purificirani proteinski derivat) (Ameni i sur 2008). Limfociti T koji su senzibilizirani ranijom infekcijom *Mycobacterium tuberculosis* grupirati će se u području kože na koje je unesen tuberkulin, te će početi s lučenjem limfokina. Rezultat će biti oteklina i lokalno otvrdnuće kože uslijed lokalne vazodilatacije, edema, odlaganja fibrina i nakupljanja drugih upalnih stanica (Trajmani i sur. 2013). Reakcija se mjeri 48 do 72 sata nakon injekcije i to prema veličini infiltrata (induracije) na mjestu primjene tuberkulina (Slika 16).



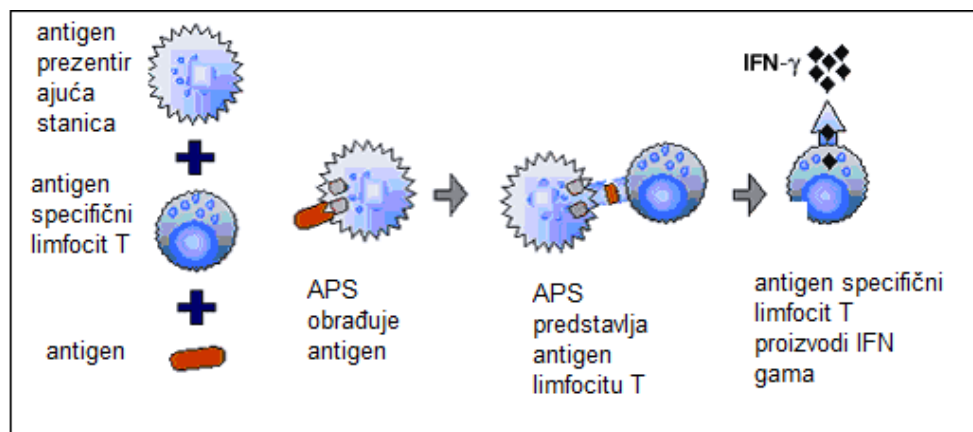
**Slika 16. Mjerenje reakcije. Preuzeto sa [www.healthunit.org](http://www.healthunit.org).**

Reaktorima se smatraju osobe preosjetljive na tuberkulin: negativan je nalaz infiltracija <5 mm, pozitivan nalaz infiltracija od 5 do 14 mm, jaka reakcija je >15 mm i vrlo jaka reakcija >20 mm. Infiltracija >15 mm u prethodno cijepljenih osoba, odnosno >5 mm u necijepljenih osoba suspektna je na infekciju *M. tuberculosis*. Paradoksalna odsutnost kožne osjetljivosti na tuberkulin kod osoba zaraženih bacilom tuberkuloze naziva se anergijom (Majić Milotić i sur. 2011).

Tuberkulinski test, nakon što je u upotrebi više od stoljeća, jest test čije su kliničke primjene dobro proučene. Ipak, test ima određena ograničenja, poput (Trajmani sur. 2013):

- Smanjene osjetljivosti na test zbog pothranjenosti, uznapredovale tuberkuloze ili imunodeficijencije;
- Smanjene specifičnosti testa u populaciji koja je u djetinjstvu cijepljena BCG cjepivom, pri čemu postoji prevalencija netuberkuloznih mikobakterija;
- Mjerenje reakcije podložno je subjektivnoj ocjeni zdravstvenog radnika.

**Testovi IGRA (engl. Interferon Gamma Release Assay)** krvni su, *in vitro* testovi koji se primjenjuju u dijagnostici latentne i aktivne tuberkuloze, pri čemu detektiraju antigene koji su specifični upravo za *Mycobacterium tuberculosis*, te stoga nisu prisutni u BCG cjepivu ili netuberkuloznim vrstama roda *Mycobacterium*.



Slika 17. Princip testova IGRA. Prilagođeno sa [www.stanford.edu](http://www.stanford.edu).

Nekoliko je varijanti testova danas u primjeni: QuantiFERON-TB Gold (QFT-G), QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-GIT) i ELISpot (T-SPOT.TB). Svi oni oslanjaju se na isti mehanizam djelovanja (Slika 17): limfociti T osobe koja je ranije inficirana bakterijom *Mycobacterium tuberculosis* će početi s lučenjem citokina interferona  $\gamma$  prilikom restimulacije senzibilizirane osobe specifičnim antigenom.

QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) i QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-GIT) su testovi ELISA (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) koji analiziraju cjelokupni uzorak krvi. Testovima se ELISA metodom mjeri količina otpuštenog interferona  $\gamma$  kao odgovor na

stimulaciju limfocita T dvama antigenima u slučaju testa QFT-G (ESAT-6 (engl. early secretory antigenic target-6), CFP-10 (engl. culture filtrate protein-10)). Test QFT-GIT uz ESAT-6 i CFP-10 antigene uključuje stimulaciju i trećim antigenom TB7.7 (Majić Milotić i sur. 2011; Trajmani sur. 2013).

Metoda ELISA mjeri količinu oslobođenog interferona  $\gamma$  indirektno, preko enzimske reakcije kojom nastaje obojeni produkt, čiju je količinu moguće utvrditi spektrofotometrijski. U najjednostavnijoj izvedbi oslanja se na tzv. „sandwich-metodu“: na plastičnoj površini mikrotitarske pločice nalaze se nekovalentno vezana protutijela (engl. capture antibody). Ta antitijela prilikom inkubacije vežu molekule ciljanog citokina, interferona  $\gamma$ . Na molekule citokina vežu se druga protutijela (engl. detection antibodies), koja su pak konjugirana direktno s enzimom ili s biotinom. Na molekule biotina, a preko molekula avidina koje imaju visoki afinitet prema biotinu, veže se konjugirani enzim. Dodatkom supstrata za enzim pokreće se enzimska reakcija – količina oslobođenog obojenog produkta proporcionalna je količini enzima, a koja je pak upravo proporcionalan količini vezanog antigena (u slučaju ovih testova interferona  $\gamma$ ).

ELISpot (T-SPOT.TB) pretpostavlja izolaciju perifernih mononuklearnih leukocita iz ukupne krvi, te mjerenje broja mononuklearnih stanica koje produciraju interferon  $\gamma$  po stimulaciji antigenima ESAT-6 i CFP-10 (Majić Milotić i sur. 2011; Trajmani sur. 2013). Pločice za kultivaciju mononuklearnih leukocita na svojoj površini imaju nekovalentno vezana specifična protutijela za mjereni citokin (interferon  $\gamma$ ). Ciljne stanice izlože se specifičnim antigenima (ESAT-6 i CFP-10). Slijedi inkubacija s antiinterferon  $\gamma$  protutijelima na koja je konjugiran specifičan enzim ili biotin. Ta antitijela prepoznaju drugu antigensku determinantu traženog interferona  $\gamma$ . Daljnji postupak tipičan je za metodu ELISA. Dobiveni rezultati vide se kao točkice (engl. spots) na mjestima na kojima je došlo do enzimske reakcije, odnosno na mjestima sekrecije interferona  $\gamma$  od strane ispitivanih stanica. Ovisno o veličini pojedine točkice moguće je polukvantitativno odrediti količinu sintetiziranog interferona  $\gamma$ .

**2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

## CILJ ISTRAŽIVANJA

---

Cilj istraživanja je analizirati povezanost imunskog statusa koji je procijenjen temeljem broja CD4<sup>+</sup> limfocita T i rezultata testa kvantifikacije IFN- $\gamma$  u supernatantu limfocita periferne krvi nakon stimulacije antigenima *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (kvantiferonski test) kojim se otkriva latentna tuberkuloza. U radu će biti određen broj pozitivnih i negativnih rezultata kvantiferonskog testa u skupini HIV-om zaraženih osoba iz Hrvatske kao i broj neodređenih rezultata koji se povezuju sa previsokom ili preniskom endogenom koncentracijom/sekrecijom IFN- $\gamma$ . Analizirat će se broj pozitivnih i neodređenih rezultata u HIV-om zaraženih osoba obzirom na broj CD4<sup>+</sup> limfocita T (skupine <200; 201-350 i >351 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L krvi) te omjer CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> limfocita T.

**3. MATERIJAL I METODE**



## 3.1 ISPITANICI

Istraživanje je provedeno na uzorcima periferne krvi 783 ispitanika (zaprimljenih u razdoblju od 3 godine i 6 mjeseci, između 2008. i 2011. godine) koji su analizirani na Odjelu za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“. Ukupno 208 ispitanika od 783 (26,6%) uključenih u istraživanje je bilo zaraženo HIV-om. Kod 10 osoba zaraženih HIV-om (1,2%) te 37 (4,7%) iz kontrolne skupine koje nisu zaražene rezultat kvantiferonskog testa je bio neodrediv. Kontrolna skupina u ovom istraživanju se sastoji od HIV-negativnih osoba iz opće populacije za koje ne postoje podaci o kompromitiranom imunom statusu.

## 3.2 BIOLOŠKI UZORCI

### 3.2.1 BIOLOŠKI UZORCI ZA PROTOČNU CITOMETRIJU

Uzorci periferne krvi za citometriju volumena 3mL su uzimani u sterilne VACUTAINER epruvete s antikoagulansom K<sub>3</sub> EDTA (etilidiamintetraoctena kiselina) (Becton Dickinson Vacutainer Systems, UK). Krv se pohranjuje na sobnoj temperaturi do analize.

### 3.2.2 BIOLOŠKI UZORCI ZA QUANTIFERON-TB GOLD IN TUBE TEST

Biološki uzorci su dobiveni venepunkcijom 3 mL periferne krvi pacijenta u 3 predviđene epruvete iz kompleta materijala za provođenje testa po 1 mL u pojedinu epruvetu. Uzorci su bili inkubirani na 37 °C 24 h (minimalno vrijeme inkubacije je 16 h, maksimalno 24 h). Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 15 min na 3000 rpm da se odvoji plazma. Uzorci plazme su analizirani istog dana, no moguće ih je pohraniti na temperaturi 2-8 °C do 4 tjedna prije obrade. Uzorke je moguće uskladištiti na dulje vrijeme, no u tom slučaju se skladište na temperaturi od -20 °C ili ako je moguće -70 °C.

## 3.3 REAGENSI

### 3.3.1 REAGENSI ZA PROTOČNU CITOMETRIJU

- CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 Monoclonal Antibody Reagents for use with tetraONE SYSTEM software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD). Reagens sadrži kombinaciju monoklonskih antitijela specifičnih za molekule CD45, CD4, CD8 i CD3 za četverostruko bojanje.
- ImmunoPrep Reagent Sytem Whole blood lysing reagent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD). Reagens se sastoji od 3 otopine: Immunoprep A, B i C; koje su posebno prilagođene za pripremu uzoraka za protočnu citometriju pomoću aparata Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD).
  - Immunoprep A – formijatna kiselina (1,2 mL/L) i stabilizator, služi za lizu eritrocita
  - Immunoprep B – natrij karbonat (6 g/L), natrij klorid (14,5 g/L), natrij sulfat i stabilizator, puferira otopinu i zaustavlja lizu
  - Immunoprep C – paraformaldehid (10 g/L) i pufer, fiksira stanice
- Flow-Count TM Fluorospheres absolute count determination on CXP Flow Cytometry System (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD). Reagens sadrži fluorescentne mikrosfere poznate koncentracije (926-1023 fluorosfere/ $\mu$ L, promjera 10  $\mu$ m, emisijskog spektra 525-700 nm), te omogućuje određivanje apsolutnog broja određene stanične subpopulacije.
- Flow-Check TM Fluorospheres, Flow Cytometer Alignment Verification (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD). Reagens sadrži fluorescentne mikrosfere u koncentraciji od 106 mikrosfera/ $\mu$ L (emisijski spektar 525-700 nm, promjer 10  $\mu$ m) te služi za provjeru i kalibraciju optičkog i protočnog dijela citometra.

## MATERIJAL I METODE

---

- IsoFlow™ Sheath Fluid Azide free balanced electrolyte solution (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD). Izotonična otopina koja se miješa sa uzorkom tijekom mjerenja
- AC-T Rinse Shutdown Diluent (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD), otopina za čišćenje uređaja

### 3.3.2 REAGENSI ZA QUANTIFERON-TB GOLD IN TUBE TEST

Svi reagensi osim destilirane vode su osigurani u kompletu materijala za test QuantiFERON-TB Gold, In Tube (Cellestis GmbH, Europa) (Slika 18), i sastoje se od:

- Epruvete za negativnu kontrolu
- Epruvete s TB antigenima za određivanje rezultata
- Epruvete za pozitivnu kontrolu
- Ljudski IFN- $\gamma$ , liofilizirani standard
- Zeleni diluent (sadrži mišji serum i kazein)
- Liofilizirani, 100x koncentrirani konjugat (protutijelo na ljudski IFN- $\gamma$  konjugirano s peroksidazom hrena)
- 20x koncentrirani pufer za ispiranje
- Otopina supstrata enzima (o-fenilendiamin dihidroklorid)
- Otopina za inaktivaciju enzima
- Destilirana voda



Slika 18. Komplet materijala za test QuantiFERON-TB Gold In Tube. Preuzeto sa /www.ssi.dk/

## 3.4 POTROŠNI MATERIJAL

### 3.4.1. POTROŠNI MATERIJAL ZA PROTOČNU CITOMETRIJU

- K<sub>3</sub> VACUTAINER epruvete za uzimanje krvi (Becton Dickinson, SAD)
- Polistirenske epruvete 12x75 mm (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD)

### 3.4.2 POTROŠNI MATERIJAL ZA QUANTIFERON-TB GOLD IN TUBE TEST

- Mikrotitarske pločice (dolaze u kompletu)
- Nastavci za automatske pipete od 10 µL, 50 µL, 100 µL, 1000 µL (Thermo Fisher Scientific, USA, Gilson, SAD)

## 3.5 PRIBOR I INSTRUMENTI

### 3.5.1. PRIBOR I INSTRUMENTI ZA PROTOČNU CITOMETRIJU

- Aparat za pipetiranje uzoraka za protočnu citometriju Coulter PrepPlus 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD)
- Aparat za pripremu uzoraka za protočnu citometriju Coulter TQ-Prep (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, SAD)
- Protočni citometar CYTOMICS FC 500 (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) povezan s računalom Pentium (IBM, USA) i laserskim pisačem Business inkjet 2300 (Hewlett-Packard, SAD)
- Vorteks Vibromix (Tehtnica, Slovenija)

### 3.5.2. PRIBOR I INSTRUMENTI ZA QUANTIFERON TB GOLD IN TUBE TEST

- Inkubator Mimi Galaxy E – Rs biotech (C&M Scientific, UK)
- Centrifuga EBA 20 (Hettich FurnTech, GmbH & Co. KG, Njemačka)
- Automatske pipete od 10  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L (Eppendorf, Germany; Thermo Fisher Scientific, USA, Gilson, SAD)
- Višekanalna automatska pipeta od 50  $\mu$ L do 100  $\mu$ L (Eppendorf, Njemačka)
- Čitač mikrotitarskih pločica Capita Reader (Trinity Biotech, Irska)

### 3.6 RAČUNALNI PROGRAMI ZA ANALIZU

- Excel (Microsoft)
- CXP program za obradu podataka dobivenih citometrom (Beckman Coulter, SAD)

### 3.7. METODE

#### 3.7.1 PRIPREMA UZORAKA ZA PROTOČNU CITOMETRIJU

Uzorci pune krvi za citometriju se pripremaju na PrepPlus 2 aparatu koji pipetira u polistirenske epruvete 10  $\mu$ L željene kombinacije antitijela obilježenih fluorokromima i 100  $\mu$ L periferne krvi. Primjenjuje se metoda četverostrukog bojanja CD45-FITC/CD4-RD-1/CD8-ECD/CD-3PC-5. Uzorci se inkubiraju 10min u aparatu TQ Prep koji po isteku inkubacijskog vremena injektira u uzorke otopine Immunoprep A, B i C kako bi lizirao eritrocite i fiksirao membranu limfocita. Neposredno prije analize uzoraka citometrom, PrepPlus 2 aparat dodaje u uzorke 100  $\mu$ L Flow Count reagensa koji je potreban za izračun apsolutnog broja CD4<sup>+</sup> limfocita T. Ovakvi uzorci su sada spremni za analizu citometrom CYTOMICS FC500 te obradu programom CXP. Limfociti se od ostalih stanica odijeljuju morfološki pomoću parametra SS (engl. side scatter) i biljega CD45 (određuju granuliranost jezgre) te parametara SS i FS (engl. forward scatter) koji nam daju informacije o veličini stanice.

### 3.7.2 PRIPREMA UZORAKA ZA QUANTIFERON TB GOLD IN TUBE TEST

Uzorci periferne krvi se dobivaju venepunkcijom pacijenta po 1 mL u svaku od 3 predviđene epruvete. Epruveta sa sivim čepom ima neobložene stijenke i sadrži samo gel za razdvajanje plazme od stanica. Stijenke epruvete sa crvenim čepom su obložene antigenima *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 i TB7.7. Epruveta sa ljubičastim čepom ima stijenke presvučene mitogenom fitohemaglutininom P (nespecifični stimulator limfocita T). Pribavljeni uzorci se ručno promješaju žustro ih okrećući ih za 180° 10-ak puta kako bi se osigurao temeljit kontakt stijenki epruveta sa krvlju te inkubiraju na 37 °C na 16 do 24 h. Nakon inkubacije epruvete je potrebno centrifugirati 15 min na 3000 rpm radi lakše separacije plazme, iako ju je moguće, u nedostatku centrifuge, i direktno odvojiti od stanica uz iznimnu pažnju da se ne uznemiri talog stanica. Reagensi (osim konjugata) te uzorci plazme koji se koriste u nastavku moraju biti temperirani na sobnu temperaturu pa ih je 1 h prethodno početku rada potrebno izvaditi iz hladnjaka gdje se čuvaju.

### 3.7.3 IZVOĐENJE IMUNOENZIMSKOG TESTA (ELISA)

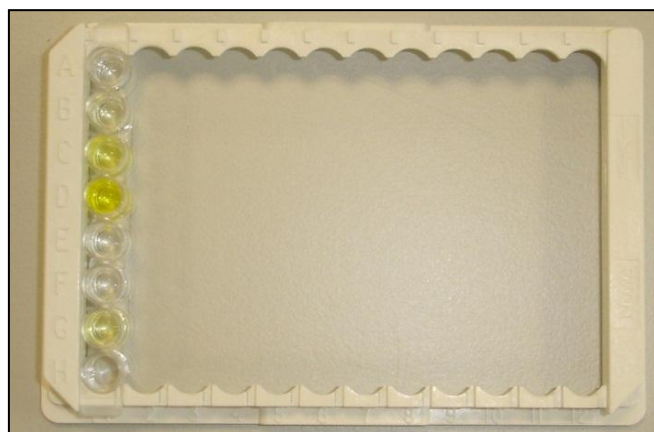
Prvo je potrebno izračunati potreban broj jažica na mikrotitarskoj pločici te pripremiti razrjeđenja standarda potrebnih za kreiranje standardne krivulje. Razrjeđenja se pripremaju od otopine standarda razrijeđenog sa zelenim diluentom u seriji od 1:4 (4 IU/mL, 1 IU/mL, 0,25 IU/mL te 0 IU/mL, s time da je najveća koncentracija zapravo čisti rekonstituirani standard, a najmanja čisti zeleni diluent).

Idući je korak priprema konjugata u potrebnoj količini ovisno o broju uzoraka. Razrjeđujemo ga također zelenim diluentom u omjeru 1:100. Zadnji korak prije izvedbe testa je vorteksiranje uzoraka plazme kako bismo bili sigurni da se IFN- $\gamma$  jednakomjerno raspodijelio. Preostaje samo punjenje jažica. U sve pripremljene jažice se stavlja 50  $\mu$ L konjugata pa onda nanose standardi te uzorci plazme u jažice u volumenu od 50  $\mu$ L. Mikrotitarska pločica se poklopi i 1 min miješa na laboratorijskoj mješalici. Nakon toga, ona se inkubira 2 h na sobnoj temperaturi u tami.

Tijekom inkubacije se priprema pufer za ispiranje. Pufer 20x koncentrirani iz kompleta za izvedbu testa razrjeđujemo sa destiliranom vodom. Po završetku inkubacije u tami

## MATERIJAL I METODE

mikrotitarska pločica je spremna za ispiranje. Potrebno ju je isprati najmanje 6 puta ostavljajući pufer da djeluje barem 5 sekundi između ispiranja. Temeljito isprana mikrotitarska pločica se tretira sa 100  $\mu$ L supstrata po jažici te miješa 1 min na miješalici kako bi se osigurala jednakomjerna distribucija supstrata. Slijedi inkubacija od 30 min u mraku na sobnoj temperaturi, nakon koje se zaustavlja reakcija injektiranjem 50  $\mu$ L po jažici otopine za inaktivaciju enzima. Mikrotitarske pločice sa zaustavljenim reakcijama (Slika 19) su stavljene na spektrofotometar kako bismo očitali optičku gustoću (Slika 20).



**Slika 19.** Mikrotitarska pločica u koraku očitavanja rezultata. Prve četiri jažice su razrjeđenja standarda, a slijedeće četiri reprezentativni uzorak.

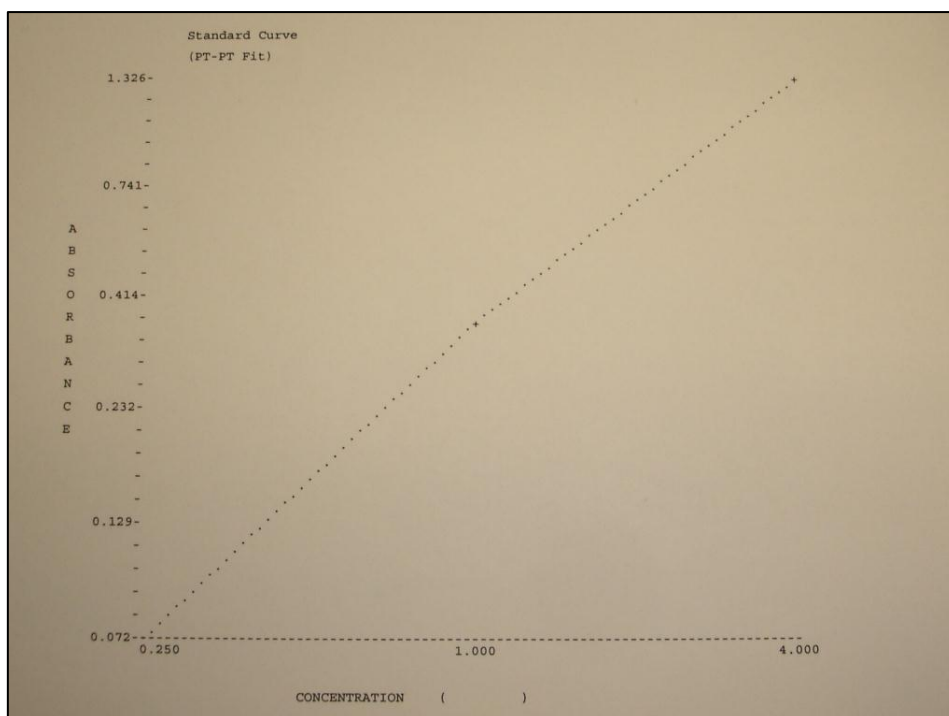
```
< > around RSLT indicate extrapolated concentration.
  1  2  3  4  5  6  7  8  9  10  11  12
=====
CELL * * * * *
CALODD* 0.000 * * * * *
Well * BLK * * * * *
RSLT * +0.001 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* 0.072 * * * * *
Well * STD1 * * * * *
RSLT * 0.290 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* 0.343 * * * * *
Well * STD2 * * * * *
RSLT * 1.000 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* 1.326 * * * * *
Well * STD3 * * * * *
RSLT * 4.000 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* 0.001 * * * * *
Well * SMP1 * * * * *
RSLT * +0.006 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* 0.001 * * * * *
Well * SMP2 * * * * *
RSLT * +0.008 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* 0.177 * * * * *
Well * SMP3 * * * * *
RSLT * 0.933 * * * * *
=====
CELL * * * * *
CALODD* * * * * *
Well * * * * *
RSLT * * * * *
```

**Slika 20.** Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja reprezentativnog uzorka

## MATERIJAL I METODE

---

Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja se uz pomoć kalibracijske krivulje (Slika 21) tumače kao pozitivni, negativni ili neodređivi.



Slika 21. Kalibracijska krivulja.

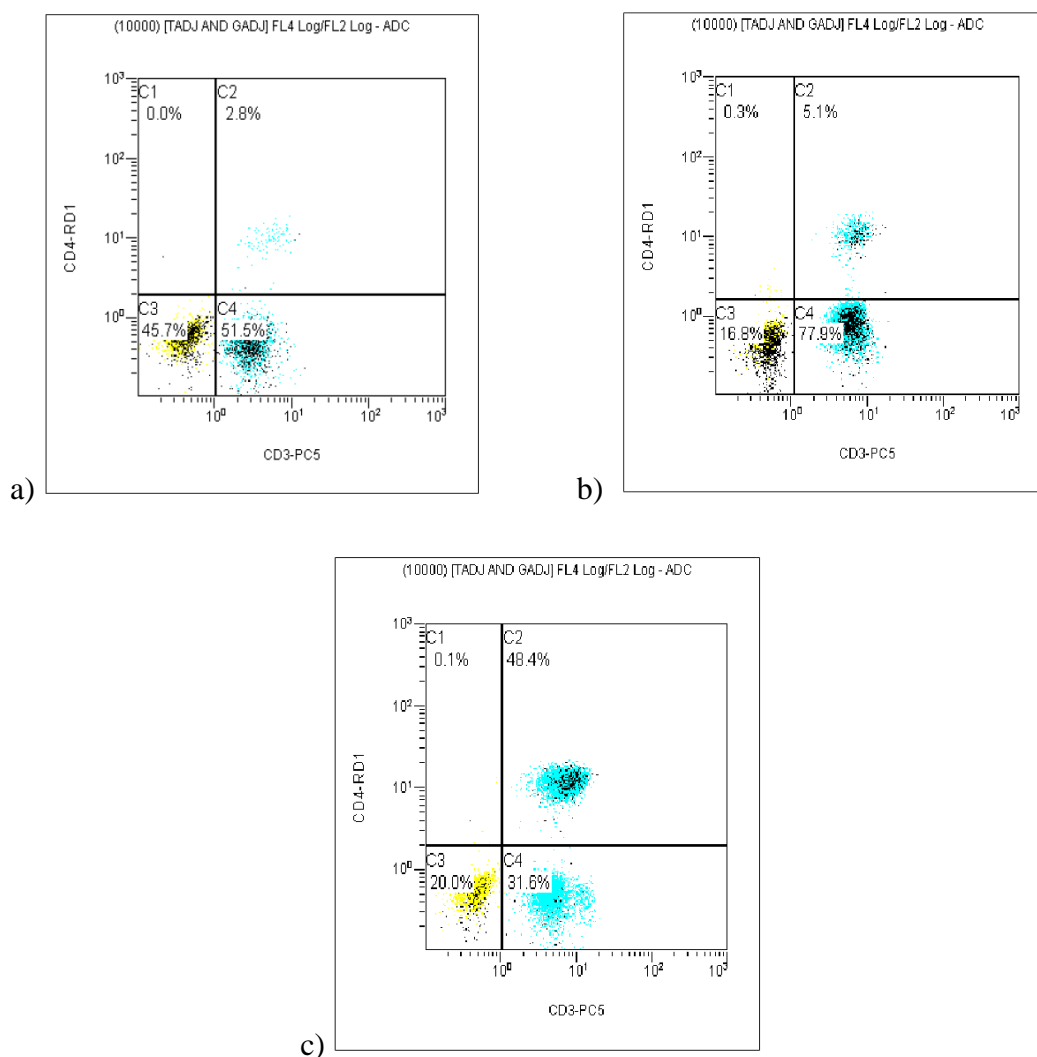




## 4.1 ODREĐIVANJE APSOLUTNOG BROJA CD4<sup>+</sup> LIMFOCITA T

Apsolutni broj CD4<sup>+</sup> limfocita T po mikrolitru krvi se određuje direktno na citometru pomoću specifičnog kvantifikacijskog reagensa no princip metode je miješanje identičnih volumena krvi i kvantifikacijskog reagensa koji omogućava izračunavanje omjera između broja stanica u krvi i fluorosfera (mikročestica konjugiranih s fluoroforima) u jedinici volumena. Poznavajući koncentraciju fluorosfera, apsolutni broj limfocitne subpopulacije se izračunava pomoću formule:

$$\text{apsolutni broj} \left( \frac{\text{stanica}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{\text{ukupni broj izbrojenih stanica}}{\text{ukupni broj izbrojenih fluorosfera}} \times \text{koncentracija fluorosfera}$$

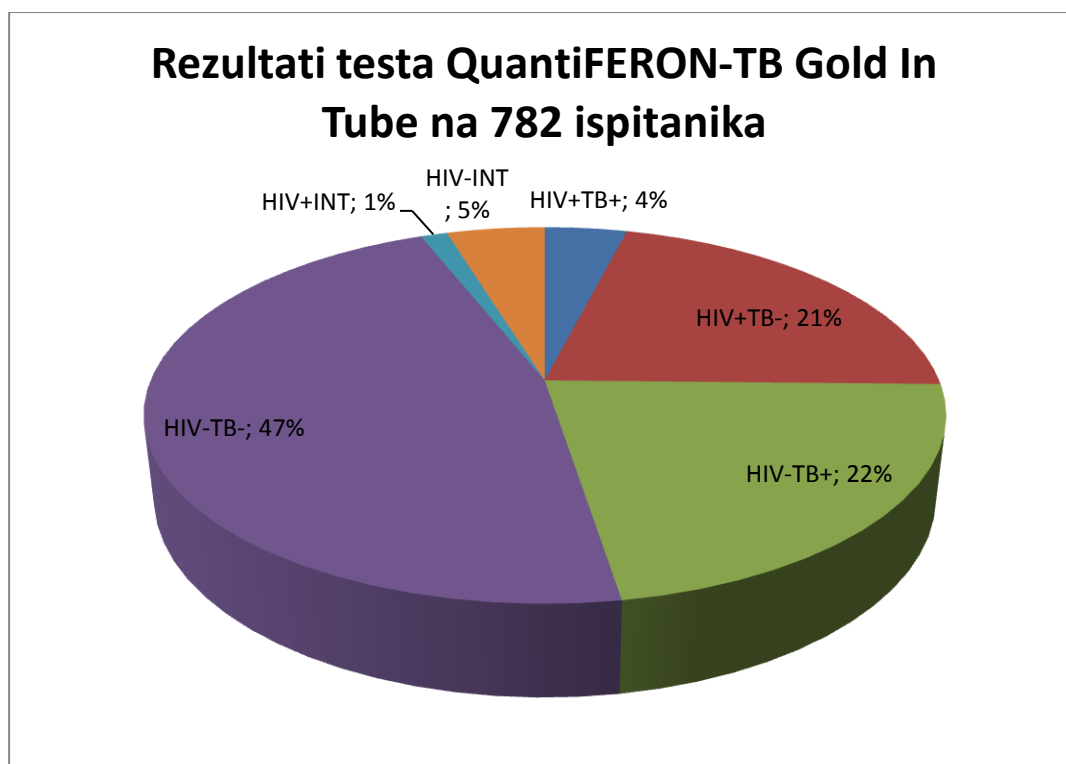


**Slika 22.** Primjeri imunofenotipizacije limfocita u perifernoj krvi ispitanika a) sa manje od 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L krvi, b) sa 200 do 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L, c) sa više od 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L.

### 4.2 ANALIZA REZULTATA KVANTIFERONSKOG TESTA

Istraživanje je provedeno na 782 uzorka periferne krvi pacijenata Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ zaprimljenih na Odjel za protočnu citometriju i molekularnu dijagnostiku. 208 ispitanika su bili zaraženi HIV-om, dok ih je 574 bilo HIV negativno.

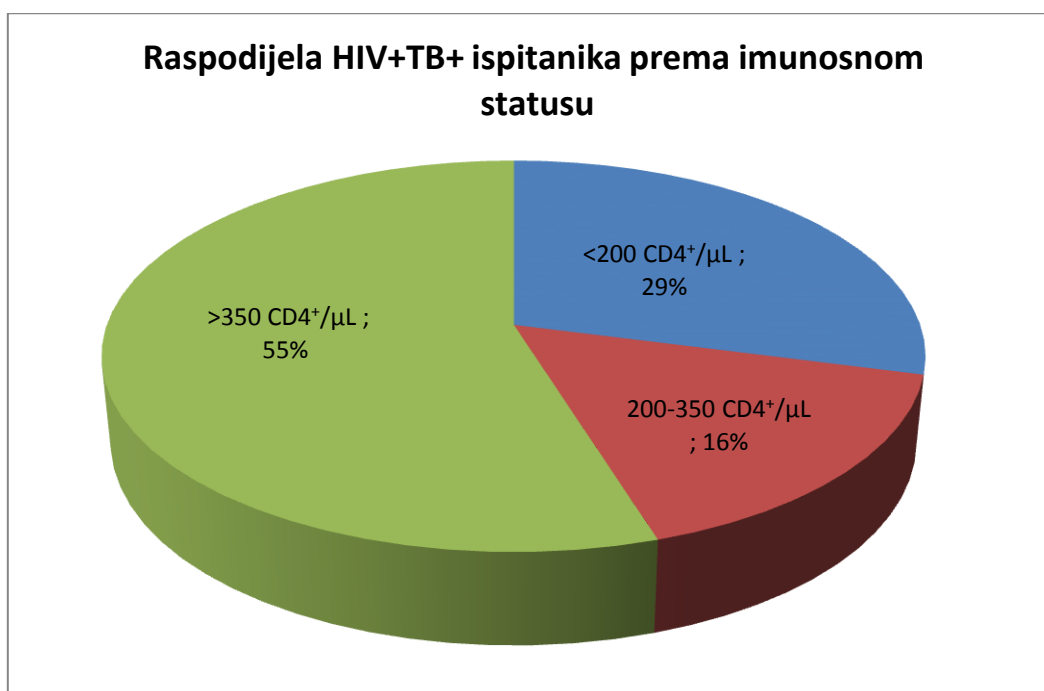
Slika 23 prikazuje raspodjelu rezultata kvantiferonskog testa u skupnoj populaciji svih sudionika istraživanja. U skupini HIV-om zaraženih osoba, kvantiferonski test je bio pozitivan na antigene *Mycobacterium tuberculosis* u 31 od 208 (14,9%) osoba. 167 ih je bilo negativno. U 10 od 208 (1,2%) HIV-om zaraženih osoba rezultat kvantiferonskog testa je bio neodrediv. Kod pacijenata koji nisu HIV<sup>+</sup> 173 su bili pozitivni na tuberkulozu, 364 negativni, a kod 37 smo dobili neodrediv rezultat testa.



Slika 23. Rezultati testa QuantiFERON TB Gold In Tube na 782 ispitanika (INT je oznaka za neodređen rezultat testa).

### 4.3 REZULTATI KVANTIFERONSKOG TESTA U HIV-OM ZARAŽENIH ISPITANIKA OBZIROM NA IMUNOSNI STATUS

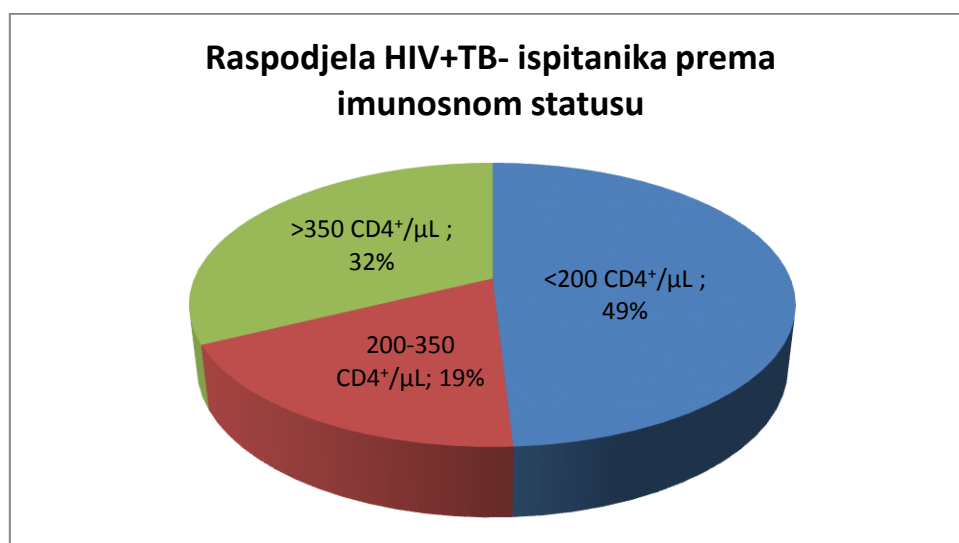
Analizirali smo imunوسي status HIV-om zaraženih osoba s pozitivnim rezultatom na kvantiferonski test. Ispitanike smo podijelili prema broju CD4<sup>+</sup> limfocita T u krvi u 3 skupine: oni koji imaju manje od 200, oni koji imaju između 200 i 350 te oni sa više od 350 CD4 limfocita T po mikrolitru periferne krvi. Raspored rezultata (Slika 24) je bio slijedeći: 9 ispitanika je imalo manje od 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T po mikrolitru krvi (29%), skupina s 201 do 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T je sadržavala 5 ispitanika (16%), a 17 ispitanika (55%) je imalo više od 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T po mikrolitru krvi.



**Slika 24.** Raspodijela HIV<sup>+</sup>TB<sup>+</sup> ispitanika prema imunosiom statusu, odnosno broju CD4<sup>+</sup> limfocita T po mikrolitru krvi.

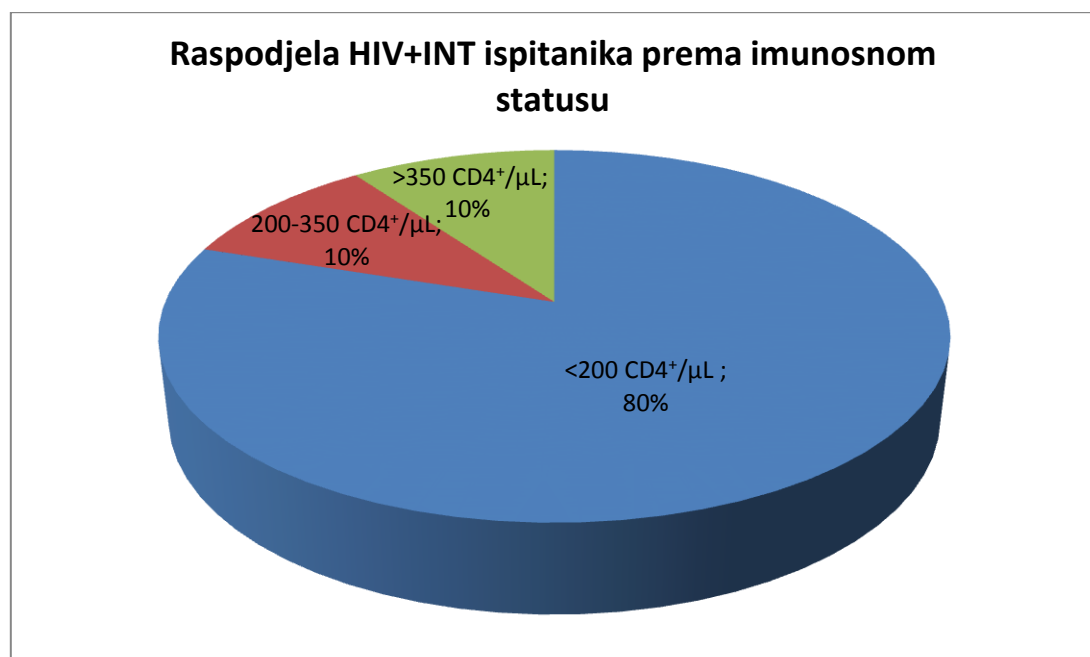
Od HIV-om zaraženih ispitanika čiji je rezultat na kvantiferonski test bio negativan (Slika 25), 82 ih je imalo manje od 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T (49%) po mikrolitru krvi, 31 ih se našlo u središnjoj skupini sa 201 do 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T (18,5%), a 54 uzorka su sadržavala više od 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T po μL krvi (32,3%).

## REZULTATI



**Slika 25. Raspodjela HIV<sup>+</sup>TB<sup>-</sup> ispitanika prema imunosnom statusu, odnosno broju CD4<sup>+</sup> limfocita T po mikrolitru krvi.**

Značajno je istaknuti važnost broja CD4<sup>+</sup> limfocita T u kontekstu neodredivih rezultata kvantiferonskog testa (Slika 26). Čak 8 od ukupno 10 HIV-om zaraženih osoba sa neodredivim rezultatom na kvantiferonski test pripadalo je u skupinu osoba sa opsežnom deficijencijom stanične imunosti tj. sa manje od 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL krvi, a po jedan ispitanik je pripadao u skupinu osoba sa između 200 i 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL krvi, odnosno sa više od 350 CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL periferne krvi.



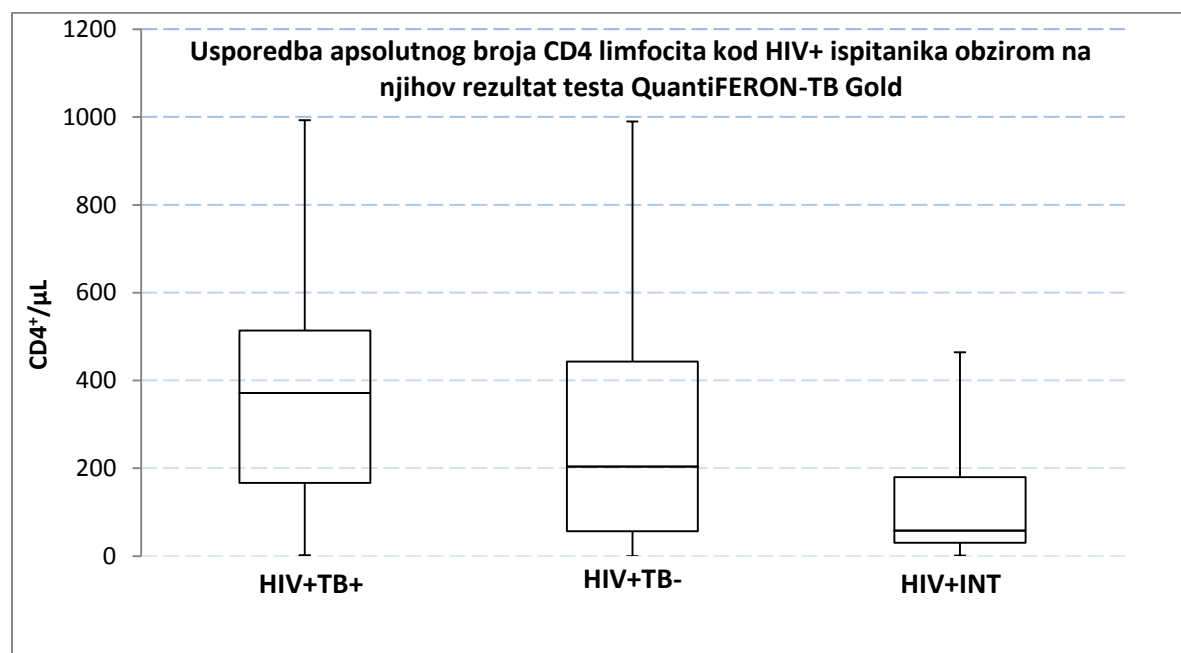
**Slika 26. Raspodjela HIV<sup>+</sup>INT ispitanika prema imunosnom statusu, tj. broju CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL krvi**

## 4.4 PARAMETRI CD4<sup>+</sup> LIMFOCITA T KOD HIV-OM ZARAŽENIH ISPITANIKA IZ PROUČAVANE SKUPINE UZORAKA

Postotak i broj CD4<sup>+</sup> limfocita T, kao i omjer postotaka CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T, je određen metodom protočne citometrije te grafički iskazan kao medijan i raspon za 3 proučavane grupe uzoraka.

### 4.4.1 APSOLUTNI BROJ CD4<sup>+</sup> LIMFOCITA T

Medijan apsolutnog broja CD4<sup>+</sup> limfocita T skupine pozitivne na HIV i na antigene *Mycobacterium tuberculosis* iznosi 372 CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL krvi (raspon je 2 – 479 CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL krvi), dok je medijan skupine ispitanika zaraženih HIV-om, a negativnih na kvantiferonski test 204 CD4<sup>+</sup> limfocita T po mikrolitru uzorka krvi sa rasponom 0 – 990. Medijan grupe uzoraka HIV-om zaraženih osoba neodređenog rezultata na kvantiferonski test jest 58 CD4<sup>+</sup> limfocita T/μL krvi, sa rasponom vrijednosti broja stanica 1 – 464 po mikrolitru periferne krvi (Slika 27).



Slika 27. Usporedba apsolutnog broja CD4 limfocita kod HIV ispitanika obzirom na njihov rezultat testa QuantiFERON-TB Gold.

Vrijednosti apsolutnog broja CD4<sup>+</sup> limfocita T po  $\mu$ L krvi među skupinama HIV-om zaraženih osoba sa pozitivnim i onih sa negativnim rezultatom na kvantiferonski test pokazuju statistički marginalno značajne razlike ( $P=0,04$ ). Zanimalo nas je da li postoje razlike u broju CD4<sup>+</sup> limfocita T između skupina ispitanika kojima se može uspješno napraviti kvantiferonski test (zbroy skupina uzoraka sa pozitivnim i negativnim rezultatom na test) i onih sa neodredivim rezultatom testa. Rezultati usporedbe pokazali su statistički značajnu razliku u središnjim vrijednostima broja CD4<sup>+</sup> limfocita T između dvije navedene skupine ( $P$  vrijednost od 0,009).

Za populaciju zdravih osoba referentne vrijednosti apsolutnog broja CD4<sup>+</sup> limfocita T sežu od 500 do 1500 stanica po  $\mu$ L uzorka krvi (baza podataka Odjela za staničnu imunologiju i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu).

#### 4.4.2 OMJER POSTOTAKA CD4<sup>+</sup> I CD8<sup>+</sup> LIMFOCITA T

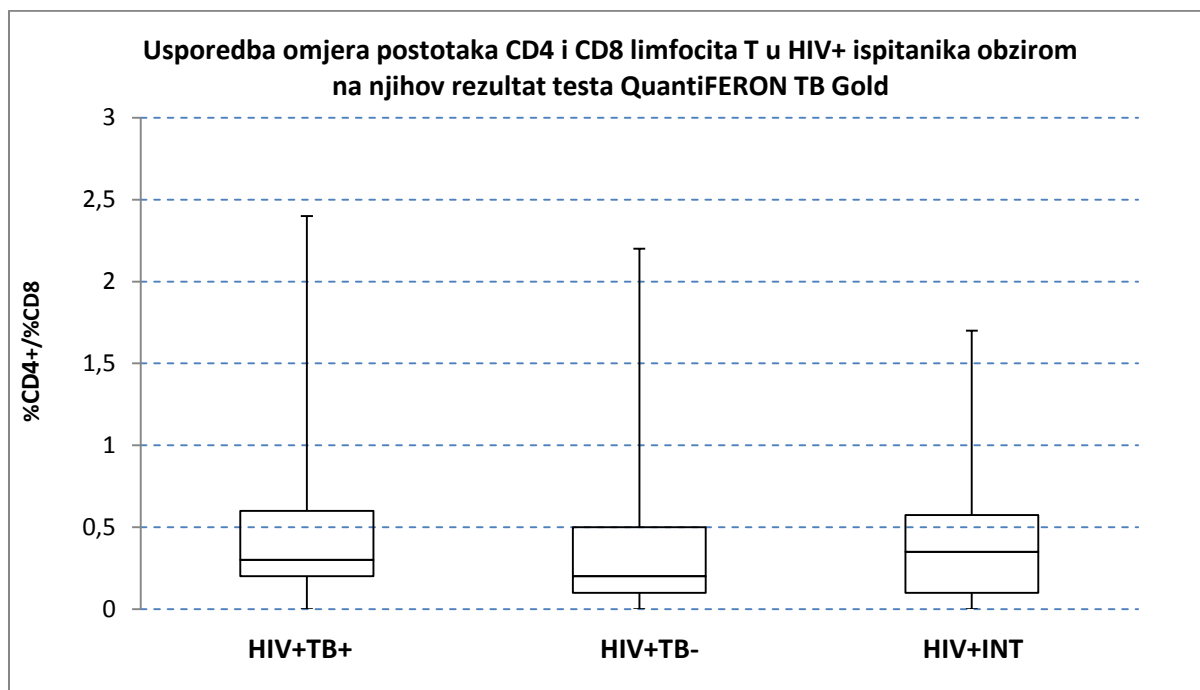
Važan parametar kompetentnosti imunskog sustava je omjer postotaka CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T koji također, moguće je, utječe na rezultate kvantiferonskog testa. Referentne vrijednosti za zdravu populaciju su od 0,9 do 3,7; za svaki CD4<sup>+</sup> limfocit dolazi od 1 do 4 CD8<sup>+</sup> limfocita (baza podataka Odjela za staničnu imunologiju i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu).

Slika 28 prikazuje, prema očekivanjima, neuravnoteženo stanje imunskog sustava HIV-om zaraženih osoba uključenih u ovo istraživanje gdje je analiza podataka otkrila inverziju omjera postotaka CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T.

Medijan vrijednosti omjera za dvostruko pozitivnu skupinu (pozitivni na HIV i na kvantiferonski test) je 0,3 (raspon 0 – 2,4). Skupina pozitivna na HIV, ali negativna na QuantiFERON je imala medijan od 0,2, a raspon vrijednosti omjera je sežao od 0 do 2,2. Vrijednosti omjera CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T za skupinu HIV-om zaraženih osoba sa neodredivim rezultatom na kvantiferonski test su se kretale od nule do 1,7, sa medijanom od 0,35.



## REZULTATI



**Slika 28. Usporedba omjera postotaka CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> limfocita T u HIV pozitivnih pacijenata obzirom na njihov rezultat testa QuantiFERON TB Gold.**

Statistički značajne razlike među ispitivanim skupinama nisu otkrivene. T-test za usporedbu populacija HIV-om zaraženih osoba pozitivnih i negativnih na kvantiferonski test je dao P vrijednost od 0,195, a u odnosu na HIV-om zaražene ispitanike sa neodređenim rezultatom 0,493.



Tuberkuloza je najraširenija bakterijska bolest na svijetu. Smatra se da je trećina svjetske populacije zaražena bacilom *Mycobacterium tuberculosis*. Prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije iz 2012. god. u 2011. godini je bilo skoro 9 milijuna novozaraženih osoba, od kojih je 13% bilo koinficirano HIV-om. Umrlo je 1,4 milijuna ljudi od kojih je 1 milijun bio HIV negativan (WHO; 2012).

Iako je prisutan trend opadanja pojave novih slučajeva, ovakve brojke ukazuju na veliku potrebu za preventivnim inicijativama i pravovremenim dijagnostičkim rješenjima na svjetskoj razini. Hrvatska spada u grupu zemalja srednje visoke prevalencije tuberkuloze i iznosi 22/100 000 (WHO, 2012). Učestalost koinfekcije HIV-om je iznosila 0,11/100 000 stanovnika. U Hrvatskoj je 2011. god. bilo 679 novooboljelih (pojavnost 15/100 000), a umrlo je 56 ljudi. Tuberkuloza je značajna oportunistička bolest u osoba s kompromitiranim imunim sustavom (HIV, maligne bolesti, idiopatska CD4<sup>+</sup> limfopenija, dijabetes, transplantacije itd.). Tuberkuloza je najčešći uzrok smrti HIV-om zaraženih osoba u svijetu.

U svrhu dijagnostike danas su na raspolaganju tuberkulinski kožni test i IGRA testovi, makar zlatni standard dijagnostike tuberkuloze ostaje dokazivanje uzorčnika u kulturi. Svaka od metoda ima prednosti i nedostatke. Izolacija uzročnika u kulturi je metoda koja nije dostupna u nerazvijenim zemljama jer zahtijeva kompleksnu tehniku i znatna financijska sredstva. Također je vremenski vrlo zahtijevna metoda. Tuberkulinski kožni test je najjeftinija raspoloživa metoda, međutim, no daje lažne pozitivne rezultate kod pacijenata koji su cijepljeni BCG-om, te je nepraktična jer iziskuje barem dva dolaska pacijenata u zdravstvenu ustanovu što predstavlja značajnu otežavajuću okolnost u suradnji znanstvenih i medicinskih radnika sa pacijentima.

Svjetska istraživanja, posebice u genomici i proteomici, su dovela do razvoja IGRA-testova (engl. *Interferon gamma release assays*) koji zaobilaze probleme koji su prisutni sa tuberkulinskim kožnim testom. IGRA testovi mjere imunološki odgovor domaćina na antigene vrlo specifične za *Mycobacterium tuberculosis*. S obzirom da proteini ESAT-6, CFP-10 i TB7.7 nisu prisutni u sojevima BCG-cjepiva, kao ni u većini netuberkuloznih bakterija (izuzev *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* i *Mycobacterium marinum*) IGRA testovi imaju veću specifičnost u detekciji uzročnika tuberkuloze.

IGRA testovi posebice su značajni jer omogućuju otkrivanje latentne tuberkuloze. HIV infekcija povećava vjerojatnost progresije latentne tuberkuloze u aktivnu za 21 do 34

puta pa je otkrivanje latentne tuberkuloze IGRA testovima iznimno značajno te omogućuje smanjenje smrtnosti od tuberkuloze (WHO, fact sheet 104, 2013). IGRA testovi značajni su u dijagnozi izvanplućne tuberkuloze (moždane ovojnice, limfni čvorovi, kosti i zglobovi...) gdje je nemoguće raditi biopsiju svih potencijalno zahvaćenih tkiva.

Od testova na otpuštanje interferona gama u Hrvatskoj je od 2006. god. u upotrebi QuantiFERON-TB Gold. U međuvremenu se počeo koristiti QuantiFERON-Gold In Tube koji sadrži uz ESAT-6 i CFP-10, dodatni antigen TB7.7 pa i s time veću specifičnost.

IGRA testovi mjere sekreciju IFN- $\gamma$  kojeg najvećim dijelom luče limfociti T (i to CD4<sup>+</sup> populacija), pa se pretpostavlja da rezultati ovog testa ovise o broju tih limfocita po mikrolitru krvi. Intenzivno se istražuje ta ovisnost, pogotovo kod ljudi koji boluju od bolesti koje eliminiraju CD4<sup>+</sup> limfocite T poput HIV-a ili idiopatske CD4<sup>+</sup> limfopenije.

Latorre i sur. (2010) su ustanovili da su IFN- $\gamma$  testovi ovisni o broju CD4<sup>+</sup> limfocita T kod HIV-om zaraženih osoba. Uspoređivali su rezultate tuberkulinskog testa sa QuantiFERON-TB Gold In Tube i T-SPOT.TB (ELISpot) testovima i pronašli da se podudaraju u 89% slučajeva, a sa tuberkulinskim testom 80-90%. Problem interpretacije rezultata jest kod uzoraka sa malim brojem CD4<sup>+</sup> limfocita T. Valja istaknuti da su dokazali samo 2 neodrediva rezultata (2,7%), a kod 19 od 20 pacijenata koji su imali <200 CD4<sup>+</sup> limfocita T po  $\mu$ L su uspješno interpretirali rezultate testa.

Rezultati Latorre i sur. (2010) sukladni su rezultatima ovog rada gdje je od 208 HIV<sup>+</sup> ispitanika, 97 imalo <200 CD4<sup>+</sup> limfocita T po  $\mu$ L, a kod samo 10 njih (10,3%) je rezultat testa bio neodrediv. Ovakvi podaci sugeriraju visoku osjetljivost testa QuantiFERON-TB Gold In Tube, iako od tih 10, osmero ih je imalo <200 CD4<sup>+</sup> limfocita T pa se može zaključiti da je to bio razlog nemogućnosti definicije rezultata.

Raby i sur. (2008) su pokazali da je nizak broj CD4<sup>+</sup> povezan i sa negativnim i sa neodredivim rezultatima. Također treba uzeti u obzir da Hrvatska zemlja srednje visoke prevalencije tuberkuloze, dok je Zambia visoke te da se u tom istraživanju radilo o aktivnoj tuberkulozi pa je moguće da u našim uvjetima ti parametri ne bi korelirali. Takvu paralelnu usporedbu testova su proveli Weinfurter i sur. (2011) u SAD-u i dobili slaganje testova u 95% slučajeva te se slažu oko nedosljednosti među testovima kod imunokompromitiranih populacija te oko velike mogućnosti postojanja lažnih negativnih rezultata.

Statistička obrada je i u ovom radu pokazala sa značajnom sigurnošću ( $P=0,009$ ) da je broj  $CD4^+$  limfocita T važan čimbenik u osjetljivosti testa i takvi rezultati se podudaraju sa većinom istraživanja provedenih na HIV-om zaraženim osobama koja se slažu da preciznost testa opada sa smanjenjem broja  $CD4^+$  limfocita T kada dolazi do anergije (Vincenti i sur. 2007; Raby i sur. 2008; Talati i sur. 2009; Latorre i sur. 2010; Winfurter i sur. 2011; Ni Cheallaigh i sur. 2013).

Zanimljiv je kompenzacijski efekt primjećen od strane Hammonda i sur. (2008), koji su primjenjivali Elispot test, da kada je broj  $CD4^+$  limfocita T malen, omjer stanica koje se aktiviraju i proizvode  $IFN-\gamma$  se povećava. Potrebne su daljnje studije da se utvrdi da li se radi o napretku tuberkuloze ili je to znak da organizam drži parazita pod kontrolom. Zasad su isto primjetili i Ni Cheallaigh i sur. (2013) jer kod njihovih uzoraka pacijenata koji su u prošlosti preboljeli aktivni oblik tuberkuloze, a u vremenu istraživanja imali nizak broj  $CD4^+$  limfocita T, broj  $CD4^+$  limfocita T više nije bio statistički relevantan prediktor rezultata testa QuantiFERON-TB Gold In Tube. Hipoteza je da zbog preboljene tuberkuloze imaju u krvi više aktiviranih T limfocita, odnosno veći omjer u odnosu na apsolutni broj. Prema očekivanjima, to nije vrijedilo za T-SPOT.TB jer on broji upravo  $CD4^+$  limfocite T.

Pretpostavlja se da je T-SPOT.TB osjetljiviji test nego QuantiFERON-TB Gold In Tube, no Talati i sur. (2009) i Ni Cheallaigh i sur. (2013) su dobili suprotne rezultate. Njihovo je istraživanje vršeno u SAD-u, odnosno Irskoj; zemljama niske prevalencije tuberkuloze pa je raspoloživost većeg broja uzoraka bila ograničena.

Weinfurter i sur. (2011) su se koncentrirali na razloge nepotpunog slaganja tuberkulinskog testa sa IGRA testovima kod grupa ispitanika visokog rizika za tuberkulozu koje je višestruko potvrđeno u različitim preduvjetima zemalja i visoke i niske prevalencije tuberkuloze, te visokog i niskog stupnja razvoja (Aabye i sur. 2009; Latorre i sur. 2010; Weinfurter i sur. 2011; Ni Cheallaigh i sur. 2013). Najvažniji faktor nepodudarnosti različitih testova je prethodna vakcinacija BCG-om (zemlje visokog i srednjeg stupnja razvoja gdje se provode sustavna cjepljenja), odnosno mjesto rođenja (imigranti iz zemalja visoke prevalencije tuberkuloze), obrazovanje i spol (veća učestalost lažno pozitivnih rezultata u muškaraca i na tuberkulnski i na kvantiferonski test) za koje nisu pronašli uspješno objašnjenje, te dob (stariji ispitanici su češće dobivali lažno negativne rezultate na

tuberkulinski kožni test, i ti se rezultati slažu sa rezultatima Cho i sur. 2012) za koju su ustanovili da se radi o smanjenju učinkovitosti stanične imunosti sa starošću ispitanika.

Kvantifikacija IFN- $\gamma$  u supernatantu limfocita periferne krvi nakon stimulacije antigenima *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (kvantiferonski test) omogućuje otkrivanje latentne tuberkuloze u većine HIV-om zaraženih osoba. Neodređeni rezultati kvantiferonskog testa prisutni su u oko 1% ispitanika i najčešći u osoba sa manje od 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L krvi.

U HIV-om zaraženih osoba sa opsežnom deficijencijom stanične imunosti potrebno je, uz kvantiferonski test, primjeniti i druge eksperimentalne metode za dijagnostiku latentne tuberkuloze te ponoviti testiranje nakon primjenjene antiretrovirusne terapije i porasta broja CD4<sup>+</sup> limfocita T iznad 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L krvi.





## ZAKLJUČAK

---

Kvantiferonski test kvantifikacije IFN- $\gamma$  u supernatantu CD4<sup>+</sup> limfocita T je imunološka metoda koja omogućuje uspješno otkrivanje latentne tuberkuloze u HIV-om zaraženih osoba različitog imunosnog statusa.

Primjenom ove metode smo došli do sljedećih zaključaka:

- Postoji korelacija između imunosnog statusa određenog brojem CD4<sup>+</sup> limfocita T i neodredivosti rezultata testa, te za pojedince sa niskim brojem CD4<sup>+</sup> limfocita T u perifernoj krvi ovaj test ima niži stupanj relevancije.
- Omjer CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> limfocita T nije faktor koji utječe na pouzdanost testa pa ga nije potrebno uzimati u obzir kod odabira metode za dijagnozu latentne tuberkuloze.

U HIV-om zaraženih osoba čiji imunosni status upućuje na loše stanje stanične imunosti potrebno je, uz kvantiferonski test, potvrditi dijagnozu drugim eksperimentalnim metodama za dijagnostiku latentne tuberkuloze. Uputno je ponoviti testiranje nakon primjenjene antiretrovirusne terapije i oporavka broja CD4<sup>+</sup> limfocita T iznad 200 CD4<sup>+</sup> limfocita T/ $\mu$ L krvi.



## LITERATURA

---

- Aabye M.G., Ravn P., PrayGod G., Jeremiah K., Mugomela A., et al. 2009. The Impact of HIV Infection and CD4 Cell Count on the Performance of an Interferon Gamma Release Assay in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *PLoS ONE* 4(1): e4220
- Abe C. 2003. Standardization of laboratory tests for tuberculosis and their proficiency testing. *Kekkaku* 78(8): 541-51.
- Aljohaney A., Amjadi K., Alvarez G.G.A. 2012. Systematic Review of the Epidemiology, Immunopathogenesis, Diagnosis, and Treatment of Pleural TB in HIV- Infected Patients. *Clinical and Developmental Immunology* Vol 2012: Article ID 842045.
- Ameni G., Hewinson G., Aseffa A., Young D., Vordermeier M. 2008. Appraisal of Interpretation Criteria for the Comparative Intradermal Tuberculin Test for Diagnosis of Tuberculosis in Cattle in Central Ethiopia. *Clinical Vaccine Immunology* 15(8): 1272–1276.
- Aubry M-C. 2012. Necrotizing granulomatous inflammation: what does it mean if your special stains are negative? *Modern Pathology* 25: S31–S38.
- Baron S. 1996. Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas.
- Bezuidenhout J., Roberts T., Muller L., van Helden P., Walzl G. 2009. Pleural tuberculosis in patients with early HIV infection is associated with increased TNF-alpha expression and necrosis in granulomas. *PLoS ONE*. 4(1):e4228.
- Brosch R., Gordon S.V., Marmiesse M., Brodin P., Buchriesser C., Eiglmeier K. 2002. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 99: 3684-3689.
- Center for Disease Control and Prevention. 2013. <http://www.cdc.gov>; pristupljeno 20.5.2013.
- Cho K., Cho E., Kwon S., Im S., Sohn I., Song S., Kim H., Kim S. 2012. Factors Associated with Indeterminate and False Negative Results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test in Active Tuberculosis. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 72:416-425
- Co D.O., Hogan L.H., Kim S.I., Sandor M. 2004. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clinical Immunology* 113(2):130-6.

## LITERATURA

---

- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Condos R., Rom W.N., Liu L.M., Schluger N.W. 1998. Local Immune Responses Correlate with Presentation and Outcome in Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157: 729-735.
- Daniel T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* 100: 1862–1870.
- Diedrich C.R., Flynn J.L. 2011. HIV-1/*Mycobacterium tuberculosis* Coinfection Immunology: How Does HIV-1 Exacerbate Tuberculosis? *Infection and Immunity* 79(4): 1407–1417.
- Ellis R.C., Zabrowarny L.A. 1993. Safer staining method for acid fast bacilli. *Journal of Clinical Pathology* 46: 559-560.
- Hammond A.S., McConkey S.J., Hill P.C., Crozier S., Klein M.R., Adegbola R.A., Rowland-Jones S., Brookes R.H., Whittle H., Jaye A. 2008. Mycobacterial T Cell Responses in HIV-Infected Patients with Advanced Immunosuppression. *The Journal of Infectious Diseases* 197 (2): 295-299.
- Health Unit 2013: [http://www.healthunit.org/infectious/tb/tb\\_test.htm](http://www.healthunit.org/infectious/tb/tb_test.htm); pristupljeno 20.8.2013.
- How *Mycobacterium tuberculosis* Causes Disease 2012. <http://lgcpublishing.com/pop01.html>; pristupljeno 3.6.2013.
- Kaufmann S.H.E. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology* 1, 20-30.
- Kolattukudy P.E., Fernandes N.D., Azad A.K., Fitzmaurice A.M., Sirakova T.D. 1997. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Molecular Microbiology*. 24: 263–270.
- Latorre I., Martinez-Lacasa X., Font R., Lacomá A., Puig J., Tural C., Lite J., Prat C., Cuchi E., Aucina V., Dominguez J. 2010. IFN- $\gamma$  response on T-cell based assays in HIV-infected patients for detection of tuberculosis infection. *BMC Infectious Diseases* 2010:10:348

## LITERATURA

---

- Majić Milotić D., Popović-Grle S., Katalinić-Janković V., Šimunović A. 2011. Usporedba nove i stare dijagnostike latentne tuberkulozne infekcije (QuantiFERON I PPD). *Liječnički Vjesnik* 133: 396–402.
- McLean K.J., Dunford A.J., Neeli R., Driscoll M.D., Munro A.W. 2007. Structure, function and drug targeting in Mycobacterium tuberculosis cytochrome P450 systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 464: 228-240.
- Microbe World. (2013), [www.microbeworld.org](http://www.microbeworld.org); pristupljeno 3.6.2013.
- Ní Cheallaigh C., Fitzgera I., Grace J., Jagjit Singh G., El-Eraki N., et al. 2013. Interferon Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent TB Infection in HIV-Infected Individuals in a Low TB Burden Country. *PLoS ONE* 8(1): e53330.
- Nyamogoba H.D., Mbuthia G., Mining S., Kikuvu G., Biegon R., Mpoke S., Menya D., Waiyaki P.G. 2012. HIV co-infection with tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in western Kenya: challenges in the diagnosis and management. *African Health Sciences*. 12(3): 305-11.
- Placido R., Mancino G., Amendola A., Mariani F., Vendetti S., Piacentini M., Sanduzzi A., Bocchino M.L., Zembala M., Colizzi V. 1997. Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Pathology*. 181(1): 31-8.
- Raby E., Moyo M., Devendra A., Banda J., De Haas P. et al. 2008. The Effects of HIV on the Sensitivity of a Whole Blood IFN- $\gamma$  Release Assay in Zambian Adults with Active Tuberculosis. *PLoS ONE* 3(6): e2489.
- Ramakrishnan L. 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*. 2012 Apr 20;12(5):352-366.
- Russell D.G., Cardona P-J., Kim M-J., Allain S., Altare F. 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nature Immunology* 10: 943– 948.
- Schluger N.W. 2005. The Pathogenesis of Tuberculosis: The First One Hundred (and Twenty-Three) Years. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 32.: 251–256.

## LITERATURA

---

Smith I. 2003. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*.16:463–496.

Stanford University 2013.

[http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/TB\\_Diagnosis/Interferon%20Gamma%20Release%20Assays.html](http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/TB_Diagnosis/Interferon%20Gamma%20Release%20Assays.html); pristupljeno 25.8.2013.

Statens Serum Institut. 2013.

<http://www.ssi.dk/Bestil/SSI%20Diagnostica/Produkter%20fra%20SSI%20Diagnostica/Immunoassays/QFT-TB%20Gold%20In%20Tube.aspx>; pristupljeno 25.8.2013.

Talati N.J., Seybold U., Humphrey B., Aina A., Tapia J., Weinfurter P., Albalak R., Blumberg H.M. 2009. Poor concordance between interferon- $\gamma$  release assays and tuberculin skin tests in diagnosis of latent tuberculosis infection among HIV-infected individuals. *BMC Infectious Diseases* 9:15

Trajman A., Steffen R.E., Menzies D. 2013. Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. *Pulmonary Medicine*. Vol 2013, Article ID 601737.

The New York Institute of Technology.2011.. <http://iris.nyit.edu/>; pristupljeno 20.5.2013.

Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2013. [www.textbookofbacteriology.com](http://www.textbookofbacteriology.com/); pristupljeno 3.6.2013.

Weinfurter P., Blumberg H.M., Goldbaum G., Royce R., Pang J., Tapia J., Bethel J., Mazurek G.H., Toney S., Albalak 2011. Predictors of discordant tuberculin skin test and QuantiFERON-TB Gold In Tube results in various high-risk groups. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 15(8):1056-1061

WHO, fact sheet 104, 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>; pristupljeno 20.8.2013.

WHO, Global tuberculosis report 2012. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/); pristupljeno 20.8.2013.

WHO, Tuberculosis country profile: Croatia.

[https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO\\_HQ\\_Reports%2F](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2F)

## LITERATURA

---

G2%2FPROD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=HR&LAN=EN&outtype=html  
; pristupljeno 20.8.2013.

Wikipedia. 2009. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Granuloma\\_mac.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Granuloma_mac.jpg); pristupljeno  
20.5.2013.

Vincenti D., Carrara S., Butera O., Bizzoni F., Casetti R., Girardi E., Goletti D. 2007.  
Response to region of difference 1 (RD1) epitopes in human immunodeficiency virus  
(HIV)-infected individuals enrolled with suspected active tuberculosis: a pilot study.  
*Clinical and Experimental Immunology*. 150(1): 91-8.