

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

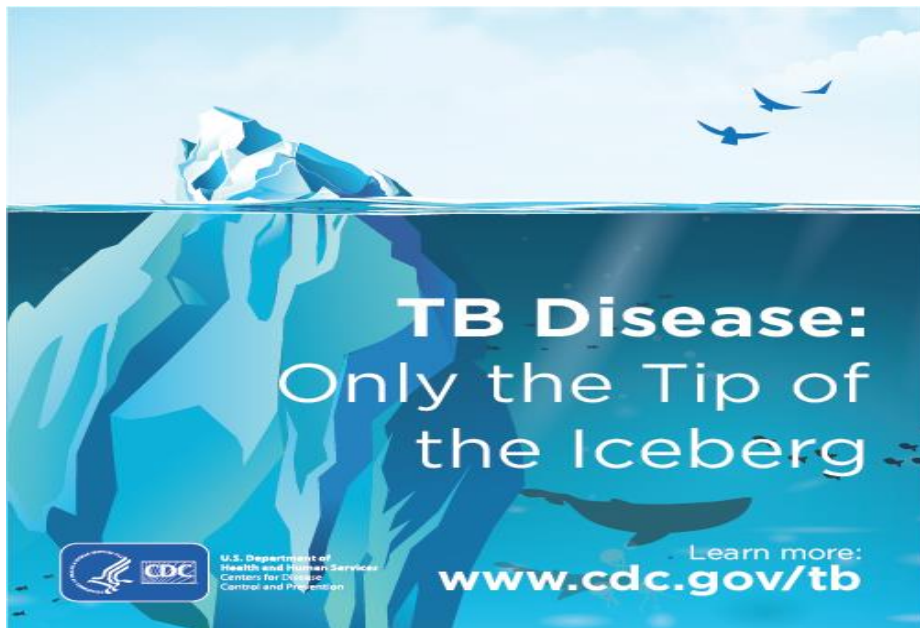
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Β΄ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΟΜΩΝΥΜΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ**

**ΓΝΑ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΜΥΚΟΒΑΚΤΗΡΙΔΙΟ ΤΗΣ  
ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΕΣ  
ΡΕΥΜΑΤΙΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ»**



**ΧΡΥΣΟΥΛΑ Β. ΧΑΤΖΑΡΑ**

**ΙΑΤΡΟΣ-ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΗ ΡΕΥΜΑΤΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2019**

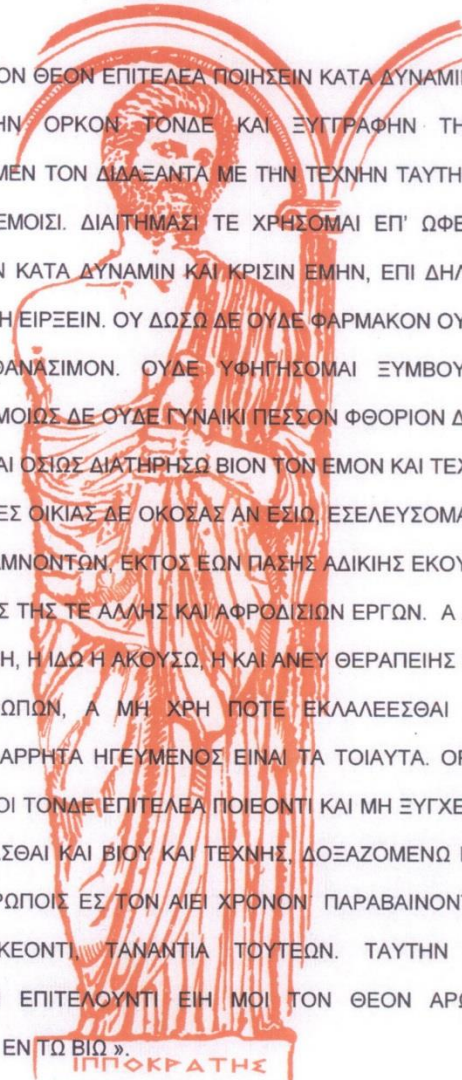
Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής υπό της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνωμών του συγγραφέως (Οργανισμός του Πανεπιστημίου Αθηνών, άρθρον 202 παρ.2, Νόμος 5343)

ΕΘΝΙΚΟΝ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

**ΕΚ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΥ ΟΡΚΟΥ  
ΚΕΙΜΕΝΟ**



« ΟΜΝΥΜΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ. ΗΓΗΣΕΣΘΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΣΚΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ. ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ. ΟΥΔΕ ΥΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ. ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ΑΓΝΩΣ ΔΕ ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ, ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤΟΣ ΕΩΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ ΤΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ, Η ΙΔΩ Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ ΒΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟΙΑΥΤΑ. ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕΑ ΠΟΙΕΟΝΤΙ ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ, ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ ΠΑΡΑ ΠΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΑΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ ΠΑΡΑΒΑΙΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΕΟΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΩΝ. ΤΑΥΤΗΝ ΤΗΝ ΕΠΑΓΓΕΛΙΑΝ ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΙ ΕΙΗ ΜΟΙ ΤΟΝ ΘΕΟΝ ΑΡΩΓΟΝ ΚΤΗΣΑΣΘΑΙ ΕΝ ΤΩ ΒΙΩ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

## ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟΣ ΟΡΚΟΣ

### ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

« ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΣΤΟ ΘΕΟ ΟΤΙ ΘΑ ΕΚΠΛΗΡΩΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΑΥΤΟ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΟΤΙ ΘΑ ΘΕΩΡΩ ΕΚΕΙΝΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΞΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΙΣΟΝ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ . ΟΤΙ ΘΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΩ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΔΙΑΙΤΑ ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΟΣΟ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ, ΚΑΙ ( ΥΠΟΣΧΟΜΑΙ ΟΤΙ ) ΘΑ ΤΟΥΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΩ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΑΔΙΚΙΑ.

ΔΕΝ ΘΑ ΧΟΡΗΓΗΣΩ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ ΣΕ ΚΑΝΕΝΑ, ΟΣΟ ΚΑΙ ΑΝ ΠΑΡΑΚΛΗΘΩ, ΟΥΤΕ ΘΑ ΥΠΟΔΕΙΩ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΕΠΙΣΗΣ ΔΕΝ ΘΑ ΔΩΣΩ ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΕΚΤΡΩΤΙΚΟ, ΑΓΝΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΗ ΘΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ. ΣΕ ΟΣΑ ΣΠΙΤΙΑ ΠΡΟΣΚΑΛΟΥΜΑΙ, ΘΑ ΜΠΑΙΝΩ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΛΟ ΤΩΝ ΑΡΡΩΣΤΩΝ, ΚΡΑΤΩΝΤΑΣ ΤΟΝ ΕΑΥΤΟ ΜΟΥ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΘΕΛΗΜΑΤΙΚΗ ΑΔΙΚΙΑ Η ΑΛΛΗ ΔΙΑΦΘΟΡΑ ΚΑΙ ΠΡΟ ΠΑΝΤΩΝ ΜΑΚΡΙΑ ΑΠΟ ΚΑΘΕ ΑΦΡΟΔΙΣΙΑΚΗ ΠΡΑΞΗ .

ΟΣΑ ΔΕ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΘΑ ΔΩ Η ΘΑ ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΠΕΡΑ ΑΠΟ ΤΙΣ ΑΣΧΟΛΙΕΣ ΜΟΥ ΣΤΗΝ ΚΑΘΗΜΕΡΙΝΗ ΖΩΗ, ΟΣΑ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΝΟΛΟΓΟΥΝΤΑΙ ΣΤΟΥΣ ΕΞΩ, ΘΑ ΤΑ ΑΠΟΣΙΩΠΩ, ΥΠΟΛΟΓΙΖΟΝΤΑΣ ΟΤΙ ΑΥΤΑ ΕΙΝΑΙ ΙΕΡΑ ΜΥΣΤΙΚΑ. ΟΣΟ ΛΟΙΠΟΝ ΘΑ ΤΗΡΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ, ΚΑΙ ΔΕΝ ΘΑ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΙΑΣΩ ΕΙΘΕ ΝΑ ΠΕΤΥΧΑΙΝΩ ΣΤΗ ΖΩΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΕΧΟΝΤΑΣ ΚΑΛΟ ΟΝΟΜΑ ΠΑΝΤΟΤΕ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΕΑΝ ΟΜΩΣ ΤΟΝ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑΙ ΓΙΝΩ ΕΠΙΟΡΚΟΣ, ΝΑ ΠΛΑΘΩ ΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ.

ΔΙΔΟΝΤΑΣ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΕΥΧΟΜΑΙ ΝΑ ΕΧΩ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΘΕΟΥ ΣΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ».

ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

*Στην οικογένειά μου,  
στον Κωστή*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Στην εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής σημαντικότερη ήταν η βοήθεια πολλών προσώπων , σε διάφορα θέματα και επίπεδα, το αθροιστικό αποτέλεσμα της οποίας απωτυπώνεται πλέον με την ολοκλήρωση της μελέτης. Με την ολοκλήρωση της διατριβής οφείλω τις ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς που συνέβαλαν με τις ενέργειές τους στο αίσιο τέλος αυτής της αλησμόνητης και κοπιαστικής εργασίας.

Κατ' αρχήν θέλω να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής, ξεκινώντας από τον Άμεσα Επιβλέποντά μου, τον Καθηγητή Παθολογίας-Ρευματολογίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, κ. Δημήτριο Βασιλόπουλο, για τον ενθουσιασμό που επέδειξε για την παρούσα διατριβή, για την εμπιστοσύνη προς το πρόσωπό μου, τις συμβουλές και τις υποδείξεις του αλλά και για την επίβλεψη της έρευνάς μου. Ξεχωριστή θέση στην εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής όλα αυτά τα χρόνια , κατέχει η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας-Βιοπαθολογίας στην Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, κα. Αιμιλία Χατζηγιάννη, η οποία μου μετέδωσε τις γνώσεις τις σχετικά με τη διενέργεια των εργαστηριακών μεθόδων καθώς και για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών και γενικότερα ο ενθουσιασμός της για την πρόοδο της μελέτης μου αποτελούσε για μένα συνεχή πηγή ενέργειας για τη συνέχιση και την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω θερμά και το έτερο μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, τον αφυπηρητήσαντα Ομότιμο Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας της Ιατρικής ΕΚΠΑ, κ. Δημήτριο Πεκτασίδη, του οποίου οι υποδείξεις ήταν πάντα καθοριστικές.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα έτερα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Παθολογίας ΕΚΠΑ, κ. Δημήτριο Μπούμπα, τον Καθηγητή Παθολογίας ΕΚΠΑ, κ. Πέτρο Π. Σφηκάκη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ρευματολογίας ΕΚΠΑ κα. Μαρία Τεκτονίδου καθώς και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, κα. Γεωργία Βρυώνη.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου της Β΄ Πανεπιστημιακής κλινικής ΕΚΠΑ, Γ.Ν.Α «Ιπποκράτειο», για τη βοήθειά του σε τεχνικής φύσεως θέματα.

Χρυσούλα Χατζάρα

Αθήνα, 2019

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΠΩΝΥΜΟ: Χατζάρα

ΟΝΟΜΑ : Χρυσούλα

Email: [hatzara@hotmail.com](mailto:hatzara@hotmail.com)

### ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ

Ιούνιος 1998: Απολυτήριο Λυκείου , 1<sup>ο</sup> ΓΕΛ Αχαρνών

Σεπτέμβριος 2000: Εισαγωγή στο Τμήμα Επιστημών Υγείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Μάιος 2010 : Άδεια ασκήσεως Ιατρικού Επαγγέλματος

Μάιος 2010- Ιούλιος 2013: Επιστημονικός συνεργάτης Μονάδα Κλινικής Ανοσολογίας-Ρευματολογίας, Β΄ Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Ιπποκράτειο ΓΝΑ, Αθήνα

Μάιος 2010-Ιούλιος 2013 : Συμμετοχή στο Τακτικό Εξωτερικό Ρευματολογικό Ιατρείο, Συμμετοχή στη Μονάδα Εγχύσεων Ρευματολογικών Ασθενών, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δ. Βασιλόπουλου

Σεπτέμβριος 2010-Ιούλιος 2013 : Εκπαίδευση και διενέργεια δερματικής φυματινοαντίδρασης και μεθόδων απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ, Ηπατολογικό/Ανοσολογικό Εργαστήριο, Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Αθηνών, υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας κας. Α. Χατζηγιάννη

Ιανουάριος 2011-Ιούλιος 2013 : Εκπαίδευση και διενέργεια Τριχοειδοσκοπήσεων, Μονάδα Κλινικής Ανοσολογίας-Ρευματολογίας, Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο Εργαστήριο, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Ιπποκράτειο ΓΝΑ, Αθήνα, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Δ. Βασιλόπουλου

Αύγουστος 2013-Ιούνιος 2014 : Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογίας, Κοργιαλένιο-Μπενάκειο Νοσοκομείο Αθηνών

Δεκέμβριος 2015-Νοέμβριος 2017 : Ειδικευόμενη Ιατρός Παθολογίας, Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική, Ιπποκράτειο Νοσοκομείο Αθηνών



## **ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

Υποψήφια Διδάκτορας Πανεπιστημίου Αθηνών υπό εκπόνηση διατριβής με θέμα: « Μελέτη της λοίμωξης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης σε ασθενείς με αυτοάνοσες ρευματικές παθήσεις» (Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας κος Δ. Βασιλόπουλος)

## **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

Αγγλικά ( Certificate of Proficiency, University of Cambridge, Certificate of Proficiency, University of Michigan)

Γερμανικά (Mittelstufe, Goethe Institut)

## **Χειρισμός Η/Υ**

Σεπτέμβριος 1998-Ιούνιος 1999 : Επιμορφωτικό σεμινάριο χρήσης Η/Υ

(βασικές έννοιες πληροφορικής, επεξεργασία κειμένου, υπολογιστικά φύλλα, βάσης δεδομένων, διαχείριση αρχείων, υπηρεσίες δικτύου, μηχανογραφημένα λογιστικά)

## **ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ – ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ**

Απρίλιος 2011-Νοέμβριος 2013 : Διαπανεπιστημιακά Μαθήματα Ρευματολογίας

Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013: Επιτυχής παρακολούθηση σεμιναρίου Advanced Trauma Life Support North Hellas

## **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ**

### **Α. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ ΕΚΠΟΝΗΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΟ ΥΛΙΚΟ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ :

1) Chrisoula Hatzara, Emilia Hadziyannis, Anna Kandili, Christos Koutsianas, Anastasia Makris, Georgios Georgopoulos, Dimitrios Vassilopoulos

«Frequent conversion of tuberculosis screening tests during anti-tumor necrosis factor therapy in patients with rheumatic diseases»

Ann Rheum Dis 2014; 74 : 1848-1853

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ:

C. Chatzara, E. Chadziyanni, A. Kandili, C. Koutsianas, A. Makris, G. Georgopoulos, D. Vassilopoulos

«Frequent conversion of screening tests for tuberculosis (Mantoux, IGRAs) in patients on anti-TNF therapy»

Mediterr J Rheumatology 2015; 26(1) : 72-73

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) C. Hatzara, A. Kandyli, A. Georgiadou, E. Hadziyannis, D. Vassilopoulos

« Frequent Conversion of Tuberculosis Screening Tests During Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Patients with Rheumatic Diseases »

Προφορική ανακοίνωση, Abstr 1626, Arthritis and Rheumatism 64 (10S), ACR 2012

2) C. Hatzara, E. Hadziyannis, A. Kandili, S. Tsikrika, M. Minopetrou, G. Georgopoulos, D. Vassilopoulos

« Rate of tuberculin skin test or interferon gamma release assay conversion during anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatic patients »

Ann Rheum Dis 2012;71(Suppl3):658

3) K. Thomas, A. Makris, C. Tsalapaki, A. Lazarini, K. Klavdianou, K. Antonatou, C. Koutsianas, C. Hatzara, E. Hadziyannis, D. Vassilopoulos,

« Frequent Conversion and reverse conversion of tuberculin skin test But not of an interferon gamma release assay (T-SPOT.TB) During Long Term Biologic Treatment of rheumatic patients »

Αναρτημένη ανακοίνωση, AB0915, EULAR 2017

## ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) Χ. Χατζάρα, Α. Χατζηγιάννη, Α. Κανδύλη, Σ. Τσικρικά,  
Γ. Γεωργιόπουλος, Δ. Βασιλόπουλος

« Συχνή θετικοποίηση των δοκιμασιών για λανθάνουσα φυματίωση σε ασθενείς με ρευματικές παθήσεις υπό αγωγή με αντι-TNF παράγοντες»

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 2012

2) Χ. Χατζάρα, Αιμιλία Χατζηγιάννη, Νικόλαος Σταμούλης, Σταματούλα Τσικρικά, Ασημίνα Γεωργιάδου, Βαρβάρα Ποδιά, Δημήτριος Βασιλόπουλος

« Έλεγχος για λανθάνουσα φυματίωση σε ασθενείς με ρευματικά νοσήματα προ της έναρξης αγωγής με βιολογικούς παράγοντες»

Προφορική ανακοίνωση στο 6<sup>ο</sup> Εθνικό Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας και Νοσοκομειακών Λοιμώξεων, Αθήνα 2013

3) Χατζάρα Χρυσούλα, Χατζηγιάννη Αιμίλια, Κανδύλη Άννα, Κουτσιανάς Χρήστος, Μακρή Αναστασία, Γεωργιόπουλος Γεώργιος, Βασιλόπουλος Δημήτριος

« Συχνή θετικοποίηση των δοκιμασιών ελέγχου για φυματίωση (MANTOUX, IGRAs) κατά τη διάρκεια anti-TNF αγωγής»

Προφορική ανακοίνωση στο 24<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 2014 (βραβείο)

4) Χ. Χατζάρα, Αν. Μακρή, Φ. Σπανού, Άν. Αναγνωστοπούλου, Ελ. Πανοπούλου, Δημήτριος Βασιλόπουλος, Αιμιλία Χατζηγιάννη

« ΈΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΛΑΝΘΑΝΟΥΣΑ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΜΕ TST ΚΑΙ ELISPOΤ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΡΕΥΜΑΤΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΑΓΩΓΗΣ ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ »

Προφορική ανακοίνωση στο 9<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Αθήνα 2016

## **B. ΛΟΙΠΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ**

### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ :

1) Vassilopoulos D., Tsirikla S., Hatzara C., Podia V., Kandili A., Stamoulis N., Hadziyannis E.

« Comparison of two gamma interferon release assays and tuberculin skin testing for tuberculosis screening in a cohort of patients with rheumatic diseases starting anti-tumour necrosis factor therapy »

Clin Vaccine Immunol. 2011 Dec;18(12):2102-8

2) Ioannis Mitroulis, Chrisoula Chatzara, Anna Kandili, Emilia Hadziyannis, Dimitrios Vassilopoulos

« Long term safety of rituximab in patients with rheumatic diseases and chronic or resolved hepatitis B virus infection »

Ann Rheum Dis 2013 Feb; 72(2): 308-10

### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) Vassilopoulos D., Hatzara C., Kandili A., Papageorgiou M., Georgiou S., Hadziyannis E.

« Safety of rituximab therapy in rheumatoid arthritis patients with current or resolved hepatitis B virus infection »

Ann Rheum Dis 2011; 70(Suppl3):609

2) C. Tsalapaki, C. Hatzara, A. Kandili, A.G. Antoniadis, E. Kyritsi, D. Vassilopoulos

«Cardiovascular comorbidities are common among greek patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study»»

2012 ABO364, Eular 2012

3)C. Koutsianas, K. Thomas, C. Hatzara, A. Kandili, C.Tsalapaki, K. Antonatou, D. Vassilopoulos

« Comparative Drug Survival of different non-anti-TNF iv Biologics after anti-TNF failure in Rheumatoid Arthritis patients »

2015 FRIO160, EULAR 2015

4) K. Klavdianou, A. Lazarini, C. Koutsianas, C. Tsalapaki, K. Thomas, C. Hatzara, K. Antonatou, D. Vassilopoulos

«Drug Survival and switching rate of TNF inhibitors in a cohort of patients with ankylosing spondylitis with long term follow up »

2016 AB0654, Eular 2016

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) A. Κανδύλη, Β. Ποδιά, Μ. Τσικρικά, Χ. Χατζάρα, Α. Χατζηγιάννη, Μ. Παπαγεωργίου, Α. Κατόγλου, Δ. Βασιλόπουλος

« Αποτελέσματα επαναληπτικού ελέγχου για λανθάνουσα φυματίωση σε ασθενείς με ρευματικές παθήσεις υπό αγωγή με anti-TNF παράγοντες »

Προφορική ανακοίνωση στο 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 2010

2) Χ. Χατζάρα, Α. Κανδύλη, Α. Χατζηγιάννη, Μ. Παπαγεωργίου, Σ. Γεωργίου, Δ. Βασιλόπουλος

« Ασφάλεια του RITUXIMAB σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα και ενεργό ή παρελθούσα λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β. »

Προφορική ανακοίνωση στο 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 2010

3) Α. Κανδύλη, Δ. Μαντζούκης, Χ. Χατζάρα, Α. Χατζηγιάννη, Μ. Παπαγεωργίου, Δ. Βασιλόπουλος

« Προκαταρκτικά δεδομένα 6 μηνών της αποτελεσματικότητας του TOCILIZUMAB σε Έλληνες ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα μετά αποτυχία σε DMARDs ή anti-TNF παράγοντες. »

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 22<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα, 2010

4) Χ. Χατζάρα, Ι. Μητρούλης, Α. Κανδύλη, Δ. Βασιλόπουλος, Α. Χατζηγιάννη

« Μακροχρόνια ασφάλεια του RITUXIMAB σε ασθενείς με ρευματικές παθήσεις και ενεργό ή παρελθούσα λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β »

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα 2012

5) Χ. Κουτσιανάς, Χ. Χατζάρα, Ι. Ιωνά, Α. Κανδύλη, Δ. Μαντζούκης, Α. Χατζηγιάννη, Δ. Βασιλόπουλος

« Δεδομένα μακροχρόνιας αποτελεσματικότητας και ασφάλειας του TOCILIZUMAB σε Έλληνες ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα μετά από αποτυχία σε DMARDs ή anti-TNF παράγοντες »

Αναρτημένη ανακοίνωση στο 23<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ρευματολογίας, Αθήνα 2012

#### **ΛΟΙΠΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ**

- Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013: Παράδοση μαθήματος στο πλαίσιο του Εκπαιδευτικού **Προγράμματος της Παθολογικής Ειδικότητας** του Ιπποκράτειου ΓΝΑ στο μάθημα **Παθολογίας Χρονίων Νοσημάτων/Κλινική Ανοσολογία-Ρευματολογία**
- Ακαδημαϊκό έτος 2012-2013: Πρόσκληση παράδοσης μαθήματος, με θέμα την εξέλιξη της φυματίωσης στην Ελλάδα 19<sup>ος</sup>-20<sup>ος</sup> αιώνας, στο ΜΠΣ «Ιστορική Δημογραφία», τμήμα Ιστορίας, Ιόνιο Πανεπιστήμιο Κέρκυρας
- Ακαδημαϊκό έτος 2013-2014: Πρόσκληση παράδοσης μαθημάτων, με θέματα την Ιστορία της Λύσσας και της Ηπατίτιδας στην Ελλάδα, στο ΜΠΣ «Ιστορική Δημογραφία», τμήμα Ιστορίας, Ιόνιο Πανεπιστήμιο Κέρκυρας

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
A. Βιολογία του TNF	σελ. 20
B. Anti-TNFα παράγοντες	σελ.24
Ειδικότητα και δραστικότητα των anti-TNFα παραγοντων	σελ.27
Τρόπος χορήγησης	σελ.28
Ανεπιθύμητες ενέργειες	σελ.28
Κλινικός έλεγχος προ της χορήγησης anti-TNFα	σελ.30
Κίνδυνος για ανάπτυξη φυματίωσης υπό anti-TNFα	σελ.31
Κίνδυνος για TB ανάλογα με τον anti-TNFα παράγοντα	σελ.32
Κλινικά χαρακτηριστικά της φυματίωσης υπό anti-TNFα	σελ.33
Γ. Η λοίμωξη από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης	σελ.35
Μικροβιολογία του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης	σελ.35
Μετάδοση	σελ.36
Ανοσολογική απάντηση	σελ.39
Μη ειδική ανοσολογική απάντηση	σελ.39
Κυτταρική ανοσολογική απάντηση	σελ.39
Το κοκκίωμα	σελ.41
Δ. Λανθάνουσα φυματίωση	σελ.48
Παθογένεση της λανθάνουσας φυματίωσης	σελ.49
Επιδημιολογία και ομάδες κινδύνου	σελ.51
Διάγνωση LTBI	σελ.54
Δερματική δοκιμασία φυματίνης	σελ.54
Μέθοδοι απελευθέρωσης Ιντερφερόνης-γ(Interferon-γ Release Assays/IGRAs)	σελ.56
Έλεγχος για LTBI σε ασθενείς υπό αγωγή με βιολογικούς παράγοντες	σελ.61
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
ΣΚΟΠΟΣ	σελ.66
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ.67
Ασθενείς	σελ.67
ΜΕΘΟΔΟΙ	
Δερματική φυματινοαντίδραση	σελ.68
Δοκιμασίες απελευθέρωσης Ιντερφερόνης-γ	σελ.69
Πρωτόκολλο τεχνικής T-SPOT.TB	σελ.70
Πρωτόκολλο τεχνικής QuantiFERON Gold In-Tube test	σελ.75
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	σελ.78
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	

Ασθενείς μελέτης	σελ.79
Χαρακτηριστικά ασθενών κατά την έναρξη της μελέτης	σελ.81
Δοκιμασίες επανελέγχου για LTBI κατά τη διάρκεια αγωγής με anti-TNFα παράγοντες	σελ.82
Παράγοντες που σχετίσθηκαν με θετικοποίηση των δοκιμασιών	σελ.87
Η επίδραση της αγωγής με anti-TNFα παράγοντες στην in vitro απελευθέρωση INF-γ	σελ.91
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	σελ.92
Ελληνική περίληψη	σελ.99
Αγγλική περίληψη	σελ.100
Βιβλιογραφία	σελ.101



# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## Εισαγωγή

Οι ασθενείς με ρευματικές παθήσεις (ΡΠ) αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό του ενήλικα πληθυσμού στη χώρα μας. Οι ΡΠ αποτελούν σημαντική αιτία αναπηρίας, είναι υπεύθυνες για το 60% των αναρρωτικών αδειών μακράς διάρκειας και οδηγούν εκτός εργασίας το 50% των ασθενών.(1) Η θεραπεία των ασθενών αυτών περιλαμβάνει τη χορήγηση κορτικοστεροειδών, μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών παραγόντων, τροποποιητικών της νόσου φαρμάκων (DMARDs) και βιολογικών παραγόντων.

Οι βιολογικοί παράγοντες τροποποιούν βιολογικές αποκρίσεις στοχεύοντας σε συγκεκριμένα μόρια και φλεγμονώδεις ή ανοσολογικές επιδράσεις. Αναφέρονται επίσης ως βιολογικές θεραπείες, τροποποιητές βιολογικών αποκρίσεων ή στοχευμένες θεραπείες.(2)

Οι ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης όγκου (anti-TNFα) είναι βιολογικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται όλο και σε περισσότερους ασθενείς για τη θεραπεία ρευματικών αλλά και άλλων χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων. Διακρίνονται δύο κατηγορίες ανταγωνιστών, τα μονοκλωνικά αντισώματα και ο διαλυτός υποδοχέα, που είναι εξίσου αποτελεσματικές για την φαρμακευτική αγωγή της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της ψωρίασης, της ψωριασικής αρθρίτιδας, των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου, των σπονδυλοαρθροπαθειών και της νεανικής ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Οι anti-TNFα χρησιμοποιούνται είτε ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με άλλα DMARDs (συνήθως μεθοτρεξάτη, λεφλουνομίδη, σουλφασαλαζίνη).

Με την κλινική εμπειρία από τη χρήση αυτών των φαρμάκων διαπιστώθηκαν όμως και σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες που αφορούν κυρίως την εμφάνιση νέων και την αναζωπύρωση παλαιών λοιμώξεων όπως η φυματίωση. Έχουν δε φανεί διαφορές μεταξύ των διαφόρων anti-TNFα παραγόντων που αφορούν είτε την αποτελεσματικότητά τους στις κοκκιωματώδεις νόσους είτε τον κίνδυνο εμφάνισης φυματίωσης. Μετά τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές και τις πρώτες σχετικές ανασκοπήσεις έχουν προστεθεί πολλές πληροφορίες και συστάσεις από διεθνείς επιστημονικές εταιρείες κυρίως αναφορικά με την πρόληψη αναζωπύρωσης της φυματίωσης υπό anti-TNFα. (3)

Ο έλεγχος για φυματίωση πριν την χορήγηση anti-TNFα είναι πλέον απαραίτητος, όπως και η χημειοπροφύλαξη των ασθενών με λανθάνουσα φυματίωση χωρίς την παρουσία ενεργού νόσου. Ο προληπτικός αυτός έλεγχος περιλαμβάνει την λήψη ιστορικού έκθεσης στο μυλοβακτηρίδιο της φυματίωσης (*Mycobacterium Tuberculosis-M.Tb*), την κλινική εξέταση, τη διενέργεια απλής ακτινογραφίας θώρακα και τη διενέργεια της δοκιμασίας φυματίνης (Tuberculin Skin Test-TST) ή/και των δοκιμασιών απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γάμμα (Interferon Gamma Release Assays-IGRAs).

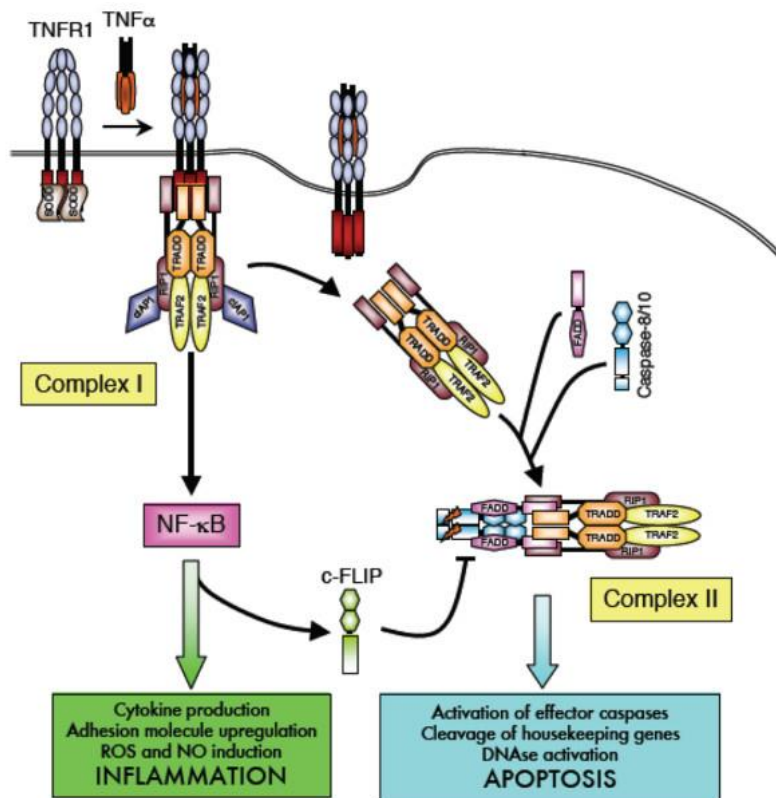
Παράλληλα με τον επιβεβλημένο προληπτικό έλεγχο πριν την έναρξη θεραπείας με anti-TNFα έχουν προκύψει σημαντικά ερωτήματα που αφορούν την ανάγκη επανάληψης ή όχι των ανωτέρω δοκιμασιών κατά την διάρκεια της αγωγής σε ασθενείς με αρνητικό αρχικό έλεγχο, με στόχο την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας αναζωπύρωσης ή έκθεσης στο M. Tb.

## **A. Βιολογία του TNF**

Ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου (TNF) είναι μια κυτταροκίνη που παράγεται από ανοσοδραστικά κύτταρα όπως μακροφάγα, μονοκύτταρα, λεμφοκύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα.

Μέλη της υπερικογενείας του TNF (με κύριους εκπρόσωπους τους TNF-α και TNF-β) και του υποδοχέα του TNF (TNFR) έχουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο TNF-α προάγει τη φλεγμονή μέσω της απελευθέρωσης φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη 1, 6, 8 (IL-1, IL-6 και IL-8) και μέσω αυξημένης έκφρασης μορίων προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων.(4-6) Ο TNFα παράγεται αρχικά ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη (tmTNF), η οποία κατόπιν διασπάται σε διαλυτή μορφή (sTNF) από μια μεταλλοπρωτεάση. (7-9) Η βιολογική του δραστηριότητα προκύπτει με τον σχηματισμό από τρία μονομερή ενός τριμερικού TNFα, που έπειτα συνδέεται με τους υποδοχείς TNFR1 (CD120a) και TNFR2 (CD120b) στην επιφάνεια του κυττάρου. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ο ολιγομερισμός των υποδοχέων.(10-12)

Οι υποδοχείς TNFR1 και TNFR2 έχουν κάποιες κοινές αλλά και ορισμένες διακριτές λειτουργίες. Συνδέονται και οι 2 με τον TNFα μέσω μιας εξωκυττάριας περιοχής με υψηλή περιεκτικότητα σε κυστεΐνη και σηματοδοτούν αντιαποπτωτικά και προφλεγμονώδη μονοπάτια. Ο TNFR1 μπορεί επίσης να σηματοδοτήσει μονοπάτια που εξαρτώνται από την death-domain κασπάση με αποτέλεσμα την απόπτωση (Εικόνα 1).(6)



**Εικόνα 1. Ενδοκυττάριο μονοπάτι του TNFR1(15)**

Πειράματα με knockout ποντικούς για τους TNFR1 και TNFR2 έχουν δείξει ότι ο TNFR1 είναι απαραίτητος για την άμυνα ενάντια σε βακτηριακές λοιμώξεις, ενώ ο TNFR2 παίζει ρόλο στη μείωση των φλεγμονωδών σημάτων που διαμεσολαβούνται από τον TNFα.(13;14) Αυτές οι διαφορές μπορεί να παρέχουν ξεχωριστές ιδιότητες στις δύο μορφές του TNF, αφού οTNFR2 ενεργοποιείται πλήρως από τον διαμεμβρανικό tmTNF αλλά όχι από τον διαλυτό TNFα.(15)

Ο TNFα έχει κεντρικό ρόλο στην αρχική απόκριση του ξενιστή στη λοίμωξη. (5;15;16) Στη λοίμωξη από *M.Tb* οδηγεί στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, στη στρατολόγηση κυττάρων, στο σχηματισμό καθώς και στη διατήρηση της ακεραιότητας του κοκκιώματος.(17-22) Ποντικοί που είτε δεν φέρουν το γονίδιο για τον TNFα ή τον TNFR1 είτε τους χορηγείται anti-TNFα μονοκλωνικό αντίσωμα, δεν περιορίζουν τη λοίμωξη μετά την έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο.(18;20) Άλλες μελέτες σε ποντικούς έχουν αποκαλύψει τη σημασία που έχουν ο TNF, ο TNFR1 και ο TNFR2 στην άμυνα εναντίον

άλλων ενδοκυττάρων παθογόνων όπως *Listeria monocytogenes* και *Salmonella typhimurium*.(13;23-25)

Σε αρκετές μελέτες έχει διερευνηθεί ο ρόλος της στενά σχετιζόμενης λεμφοτοξίνης (παλαιότερα μάλιστα ονομαζόταν TNFβ) στην άμυνα έναντι του μυκοβακτηριδίου. Η ενεργός λεμφοτοξίνη είναι ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από α και β υπομονάδες. Knockout ποντικοί είτε για τη λεμφοτοξίνη α είτε για τη β, έχουν αυξημένο βακτηριδιακό φορτίο στους πνεύμονες μετά την έκθεση στο *M.Tb*. (26;27).

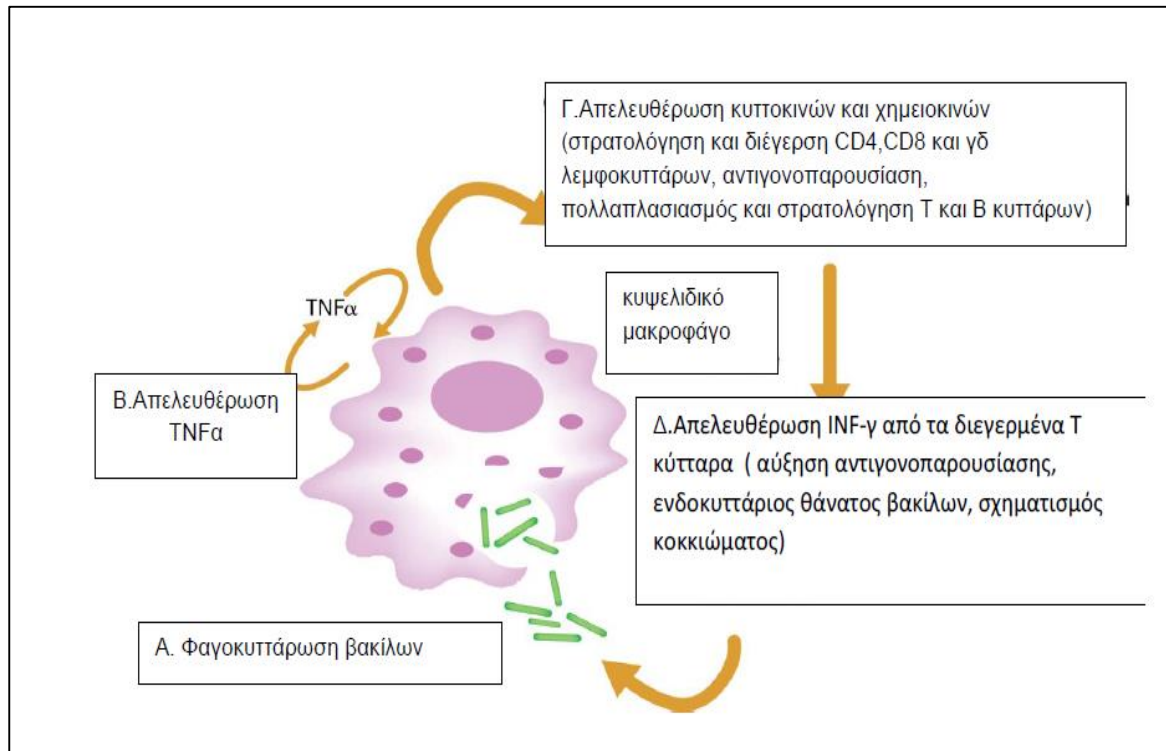
Ποντικοί, που δεν διαθέτουν TNF και λεμφοτοξίνη, είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς στη δοκιμασία με εξασθενημένα μυκοβακτηρίδια όπως το *Mycobacterium bovis* (BCG). (28) Ωστόσο, η λεμφοτοξίνη μόνη της δεν φαίνεται να είναι σε θέση να οδηγήσει στο σχηματισμό του κοκκιώματος σε TNFα knockout ποντίκια γεγονός που δείχνει τους διακριτούς ρόλους αυτών των κυττοκινών στην άμυνα του ξενιστή έναντι του *M. Tb*. (32)

Σε άλλες μελέτες έχει επίσης διερευνηθεί αν ο tmTNF παρέχει αρκετή προστασία έναντι των παθογόνων που δημιουργούν κοκκιώματα. Η διαγονιδιακή έκφραση του tmTNF φαίνεται να είναι αρκετή για να επαναφέρει την άμυνα τόσο έναντι του *M.bovis* BCG σε ποντικούς με έλλειψη του TNFα και της λεμφοτοξίνης, όσο και έναντι του λοιμοτοξικού (virulent) *M. Tb*. (22;29)

Εντούτοις, ποντικοί που εκφράζουν μόνο τον tmTNF τελικά εμφανίζουν λοίμωξη από το *M.Tb* ενώ φαίνεται ότι ο tmTNF παρέχει εν μέρει προστασία έναντι της *L.monocytogenes*.(30-32) Ως μοντέλο για τη λανθάνουσα λοίμωξη έχουν χρησιμοποιηθεί ποντικοί που ανέπτυξαν χρόνια λοίμωξη από *M.Tb* μετά την έκθεσή τους σε χαμηλής περιεκτικότητας αερόλυμα. Οι ποντικοί αποτελούν μοντέλο επιλογής λόγω του σταθερού βακτηριδιακού φορτίου και την σχετικά ανεπηρέαστη επιβίωση. Η χορήγηση σε τέτοια ποντίκια, αντισώματος που εξουδετερώνει τον TNFα, οδήγησε σε αύξηση κατά δέκα φορές του βακτηριδιακού φορτίου, εξασθένηση του κοκκιώματος και τελικά σε μείωση της επιβίωσης.(19)

Αυτά τα πειράματα επιβεβαιώνουν πόσο απαραίτητος είναι ο TNF τόσο για τον σχηματισμό όσο και για τη διατήρηση του κοκκιώματος. (Εικόνα 2) Επίσης, αναδεικνύουν τις διαφορετικές και τις κοινές λειτουργίες των

διαφόρων μορφών του TNF στην άμυνα του ξενιστή έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών, τονίζοντας με τον τρόπο αυτό την άποψη ότι η εκλεκτική αναστολή του sTNF από τους ανταγωνιστές του TNF, που χρησιμοποιούνται για την αγωγή ασθενών, πιθανόν να επιφέρει χαμηλότερο κίνδυνο για λοιμώξεις.(33)



**Εικόνα 2. Ο ρόλος του TNFα στην κυτταρική ανοσία κατά τη λοίμωξη από το *M. Tuberculosis*(33)**

## **B. Anti-TNF Παράγοντες**

Ο TNF έχει αποδειχθεί σημαντικός θεραπευτικός στόχος για την αγωγή χρόνιων φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), η αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα (ΑΣ), οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (ΙΦΝΕ), η ψωρίαση και η ψωριασική αρθρίτιδα. Αποτέλεσε την πρώτη κυτταροκίνη που αξιολογήθηκε ως θεραπευτικός στόχος για τη ΡΑ μέσω μιας σειράς προκλινικών μελετών στην ανοσοβιολογία του αρθρικού υγρού, είτε ασθενών με ενεργό νόσο είτε από προκλινικές μελέτες ζώων ή από δοκιμές σε ανθρώπους.(34) Όπως περιγράφηκε παραπάνω ο TNF εκφράζεται ως ένας διαμεμβρανικός πρόδρομος (tmTNF) που έπειτα από πρωτεόλυση δημιουργεί ένα διαλυτό ομοτριμερές. Η δέσμευση τόσο της διαμεμβρανικής όσο και της διαλυτής μορφής με τους υποδοχείς τους επάγει την παραγωγή διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, και άλλων φλεγμονωδών μορίων.

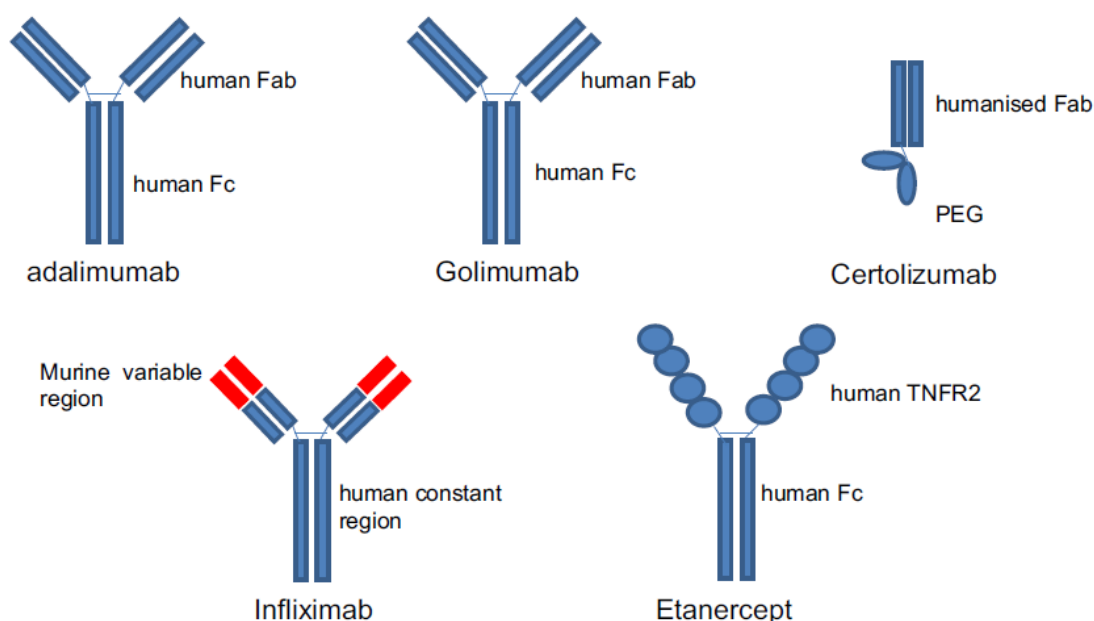
Το ενδιαφέρον για την σημασία των κυτταροκινών στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και άλλων φλεγμονωδών αρθριτιδών ξεκίνησε την δεκαετία του 1990. Τα έως τότε στοιχεία των μελετών έδειχναν ότι τόσο ο TNF, αλλά και άλλες κυτταροκίνες που προέρχονται από μονοκύτταρα, διαδραμάτιζαν σημαντικό ρόλο στην μη αναστρέψιμη καταστροφή του αρθρικού χόνδρου στην αρθρίτιδα. Η άποψη που είχε προταθεί ήταν ότι η απορύθμιση της παραγωγής TNF προκαλούσε την ανάπτυξη της ρευματοειδούς αρθρίτιδας και η πιθανή χρήση αναστολέων θα μπορούσε να χρησιμεύσει στην πρόληψη ή τη θεραπεία της νόσου.

Η πρωτότυπη εργασία που σημάδεψε την εξέλιξη της μελέτης του TNF ήταν αυτή των Keffer και συν. (1991) η οποία μελέτησε την έκφραση και τον βιολογικό ρόλο του TNF με την εισαγωγή άγριου-τύπου και 3'-τροποποιημένου ανθρώπινου TNF γονιδίου στη βλαστική σειρά ποντικών. Τα πειραματόζωα αναπτύχθηκαν φυσιολογικά, με μη ανιχνεύσιμη βιολογική δραστηριότητα του TNF στον ορό τους, υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση της έκφρασης του εξωγενούς γονιδίου είναι παρόμοια με εκείνη του ενδογενούς γονιδίου. Τα μακροφάγα αυτών των διαγονιδιακών ποντικών δεν εξέφρασαν το διαγονίδιο, γεγονός που υποδήλωνε τον άμεσο ρόλο της 3'-



περιοχής στην ειδική συσσώρευση του TNF mRNA. Επιπλέον, οι διαγονιδιακοί ποντικοί που έφεραν το τροποποιημένο γονίδιο TNF εμφάνισαν απορύθμιση της έκφρασης του γονιδίου hTNF και ανέπτυξαν χρόνια φλεγμονώδη πολυαρθρίτιδα. Το εύρημα ότι η ανάπτυξη της αρθρίτιδας στα διαγονιδιακά ποντίκια μπορούσε να κατασταλεί με αντισώματα ενάντια του ανθρώπινου TNF, επιβεβαίωσε το ρόλο της απορύθμισης της παραγωγής του TNF *in vivo*. (35)

Μέχρι σήμερα έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική τρία μονοκλωνικά αντισώματα (infliximab, adalimumab, golimumab), ένα πεγκυλιωμένο Fab κλάσμα αντισώματος (certolizumab pegol) έναντι του TNF $\alpha$  και μια πρωτεΐνη σύντηξης του υποδοχέα TNF (TNFR2) και του Fc τμήματος ανθρώπινου IgG (etanercept, Εικόνα 3)



**Εικόνα3. Απεικόνιση των Anti-TNF $\alpha$  παραγόντων. (36)**

Αν και όλοι αυτοί οι βιολογικοί παράγοντες έχουν ως στόχο τον TNF, έχουν παρατηρηθεί διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά την κλινική αποτελεσματικότητά τους στο ευρύ φάσμα των φλεγμονωδών νοσημάτων στα οποία εμπλέκεται ο TNF. (Πίνακας 1) Αυτές οι παρατηρήσεις πιθανόν να δείχνουν ότι η εξουδετέρωση του TNF ίσως δεν είναι ο μόνος μηχανισμός

δράσης τους και ότι μάλλον υπάρχουν διαφορές στη φαρμακολογία και τους μηχανισμούς δράσης αυτών των αναστολέων του TNF.(36)

	<b>Infliximab</b>	<b>Adalimumab</b>	<b>Golimumab</b>	<b>Etanercept</b>	<b>Certolizumab</b>
<b>Δομή</b>	Μονοκλωνικό αντίσωμα	Μονοκλωνικό αντίσωμα	Μονοκλωνικό αντίσωμα	p75TNFR/FcIgG πρωτεΐνη συντηξης	Ανθρωποποιημένο πεγκυλιωμένο τμήμα Fab
<b>Πλήρως ανθρώπινα</b>	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Όχι
<b>Συνδέτης</b>	TNF	TNF	TNF	TNF Λεμφοτοξίνη LTa3	TNF
<b>Μοριακό βάρος (kDa)</b>	150	150	150	150	95
<b>Χρόνος ημίσειας ζωής(ημέρες)</b>	8-10	10-14	12 ± 3	3	14

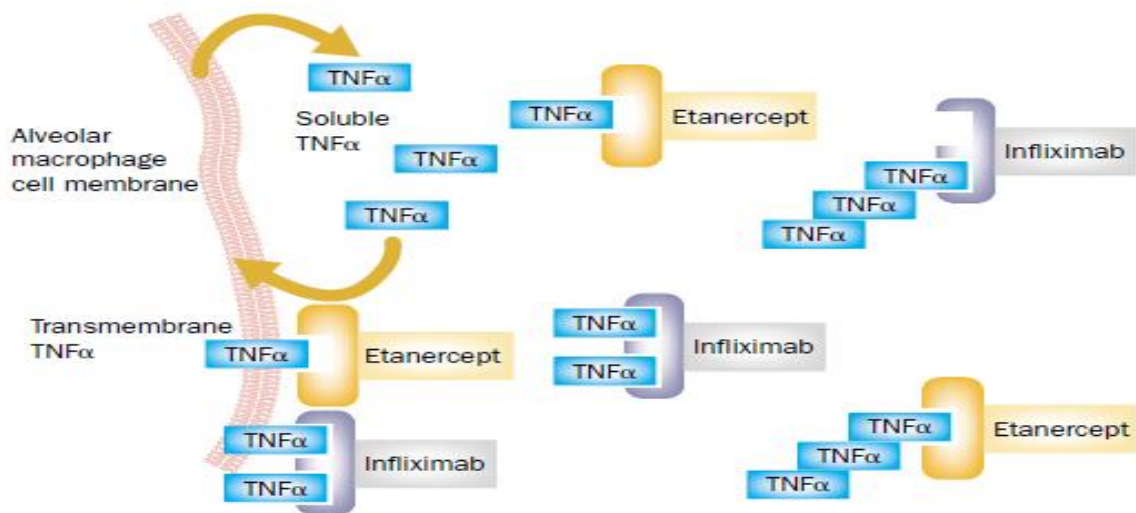
**Πίνακας 1. Οι βασικές διαφορές των Anti-TNFα παραγόντων**

## **Ειδικότητα και δραστικότητα των αντι-TNF παραγόντων**

Ο etanercept ξεχωρίζει από τους άλλους τέσσερις ανταγωνιστές του TNF αφού συνδέει και λεμφοτοξίνες (LT), ειδικότερα τη διαλυτή LTa3 και την ευρισκόμενη στην κυτταρική επιφάνεια LTa2b1. Αφού η LTa3 ασκεί τις δράσεις της μέσω των TNFR1 και TNFR2, το etanercept εξουδετερώνει την LTa3 και τον sTNF με την ίδια δραστικότητα. (37;38)

Μια πιθανή συνέπεια αυτού του ανταγωνισμού είναι πως δεν θα εξουδετερωθούν όλοι οι TNF αν οι συγκεντρώσεις της LTa3 σε κάποιον ιστό είναι παρόμοιες ή μεγαλύτερες από του etanercept. Μία ακόμα πιθανή συνέπεια της ειδικότητας του etanercept για την LT αφορά τις λειτουργικές επιπτώσεις που θα έχει η σύνδεση με την LTa2b1. Μία μελέτη για την επίδραση των anti-TNF στα B-κύτταρα ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα ανέδειξε πως το etanercept και όχι το adalimumab μειώνει τον αριθμό των B-κυττάρων μνήμης στο περιφερικό αίμα αυτών των ασθενών πιθανόν με την αναστολή της LTa. (39)

Ο TNF έχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των κοκκιωμάτων και η απενεργοποίησή του μπορεί να διαταράξει αυτές τις δομές. Σε αυτήν την ιδιότητα πιθανόν να οφείλεται η αναζωπύρωση της λανθάνουσας φυματίωσης που παρατηρείται με αυτά τα φάρμακα.(36) Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση πως ο κίνδυνος αυτός είναι χαμηλότερος με το etanercept, το οποίο είναι επίσης αναποτελεσματικό στη θεραπεία της νόσου Crohn και δυνητικά λιγότερο αποτελεσματικό στη σαρκοείδωση και στην κοκκιωματώδη πολυαγγειίτιδα (Wegener). Αυτή η παρατήρηση ίσως δεικνύει τη μειωμένη ικανότητα του etanercept να επηρεάζει τη δομή των κοκκιωμάτων.(40-43) (Εικόνα 4)



**Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις με το infliximab και το etanercept.**

Το infliximab δεσμεύεται ισχυρότερα από το etanercept στον διαμεμβρανικό TNFα και σχηματίζει ένα πιο σταθερό σύμπλοκο. Το infliximab εμποδίζει αποτελεσματικότερα την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων που διαμεσολαμβάνεται από τον TNFα. Το infliximab συνδέεται τόσο στη μονομερή όσο και στην τριμερή μορφή του διαλυτού TNFα, ενώ το etanercept δεσμεύεται αποτελεσματικά μόνο στην τριμερή μορφή. Τα σύμπλοκα etanercept-TNFα είναι ασταθή με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του διαλυτού TNFα.(33)

### Τρόπος χορήγησης

Η δόση εφόδου, όπως γίνεται με το certolizumab και το infliximab, ή η ενδοφλέβια χορήγηση, που απαιτείται για το infliximab, ίσως ευθύνονται για τη σχετικά ταχεία έναρξη δράσης αυτών των φαρμάκων σε σύγκριση με τα άλλα. Επιπρόσθετα, με την επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων φαρμάκου στο αίμα με την ενδοφλέβια έγχυση, είναι πιθανόν το infliximab να φθάνει σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο μικροπεριβάλλον των ιστών που φλεγμαίνουν και να έχει με τον τρόπο αυτό μεγαλύτερες πιθανότητες να προσδεθεί στον tmTNF.(44)

### Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι anti-TNFα αποτελούν μεγάλη πρόοδο στην θεραπεία των φλεγμονωδών νοσημάτων αφού στοχεύουν σε συγκεκριμένο μόριο, σε αντίθεση με τους μη ειδικούς ανοσοτροποποιητικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως θεραπευτική αγωγή για τις νόσους αυτές. Παρά ταύτα

έχουν καταγραφεί ανεπιθύμητες ενέργειες που έγιναν αντιληπτές κατά τη διάρκεια των κλινικών μελετών αλλά και αργότερα κατά την ευρεία χρήση τους σε ασθενείς. Αυτές οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν: λοιμώξεις, ουδετεροπενία, απομυελινωτική νόσο, καρδιακή ανεπάρκεια, αντιδράσεις στη θέση της ένεσης, αντιδράσεις κατά τη διάρκεια της έγχυσης, δερματικές αντιδράσεις, κακοήθειες και παραγωγή αυτοαντισωμάτων.

Όπως περιγράφηκε παραπάνω ο TNFα είναι σημαντικός για την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, την ενεργοποίηση των μακροφάγων, την ενεργοποίηση των φαγοσωμάτων, τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων και μακροφάγων καθώς και το σχηματισμό και λειτουργία του κοκκιώματος.(45) Οι μελέτες σε ζώα έχουν αναδείξει τη σημασία του TNF στην προστασία έναντι ποικίλων παθογόνων όπως *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis*, *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptococcus neoformans*, και *Candida albicans*.(20;46-49) Αυτοί οι μικροοργανισμοί δεν εξουδετερώνονται άμεσα από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή αλλά απομονώνονται μέσα στα κοκκιώματα που αποτελούνται από έναν κεντρικό πυρήνα με μακροφάγα, πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα καθώς και νεκρωτικά συντρίμματα τα οποία περιβάλλονται από μακροφάγα και λεμφοκύτταρα.(50) Ο TNF είναι απαραίτητος για την ομαλή στρατολόγηση αυτών των κυττάρων καθώς και για τη συνεχή διατήρηση και λειτουργία του κοκκιώματος. (33)

Σύμφωνα με τις συστάσεις του Αμερικανικού Κολλεγίου Ρευματολογίας αγωγή με anti-TNFα δεν πρέπει να χορηγείται όταν ο ασθενής έχει κάποιες από τις ακόλουθες λοιμώξεις:

- ενεργό φυματίωση ή λανθάνουσα φυματίωση για την οποία δεν έχει λάβει θεραπεία,
- ενεργό λοίμωξη με έρπη ζωστήρα,
- ενεργές βακτηριακές λοιμώξεις ή βακτηριακές λοιμώξεις για τις οποίες απαιτείται αντιμικροβιακή αγωγή,
- ενεργές κι απειλητικές για τη ζωή μυκητιάσεις,
- σοβαρές λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος (βακτηριδιακές ή ιογενείς),
- οξεία λοίμωξη από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) ή C (HCV),
- χρόνια HBV λοίμωξη χωρίς θεραπεία,

- χρόνια HBV ή HCV λοίμωξη με σημαντική βλάβη του ήπατος ( Child-Pugh τάξη B ή C), και
- δερματικά έλκη που δεν έχουν επουλωθεί. (51;52).

### **Κλινικός έλεγχος προ της χορήγησης anti-TNFα**

Πριν από την έναρξη της αγωγής είναι σημαντική η λήψη λεπτομερειακού ιστορικού με έμφαση στα κάτωθι:

- Ιστορικό συμπαγούς όγκου ή αιματολογικής κακοήθειας ή B-συμπτωματολογίας (πυρετός, απώλεια βάρους, νυχτερινές εφιδρώσεις, κνησμός).

- Ιστορικό φυματίωσης, επαφής με ασθενή με ενεργό φυματίωση ή συμπτώματα συμβατά με λοίμωξη από *M. Tuberculosis* (πυρετός, κακουχία, απώλεια βάρους, βήχας, αιμόπτυση).

- Ιστορικό χρόνιας ή υποτροπιάζουσας ιογενούς λοίμωξης (χρόνια ηπατίτιδα B ή C, λοιμώξεις από HSV ή VZV)

- Ιστορικό πολλαπλής σκλήρυνσης, απομυελινωτικής νευροπάθειας ή οπτικής νευρίτιδας - σοβαρής αποφρακτικής ή διάμεσης πνευμονοπάθειας ή συμπτώματα συνηγορητικά υπερ χρόνιας αναπνευστικής πάθησης-υποκείμενης καρδιοπάθειας (δύσπνοια προσπαθείας, ορθόπνοια και συμπτώματα καρδιακής ανεπάρκειας) - προκαρκινωμάτωδεις καταστάσεις (πολύποδες παχέος εντέρου, αχαλασία οισοφάγου, οισοφάγος Barrett).

- Επίσης πρέπει να ερωτάται η πρόσφατη χορήγηση εμβολίου με ζώντα μικροοργανισμό (BCG, εμβόλια με ζώντες ιούς) και η περίπτωση κύησης ή προγραμματισμένης κύησης.

Η λεπτομερής αντικειμενική εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη θερμομέτρηση, τον έλεγχο για λεμφαδενοπάθεια, σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία καθώς και σημεία ενδεικτικά συμπαγούς όγκου, καρδιακής ανεπάρκειας, κίρρωσης, απομυελινωτικής και χρόνιας αναπνευστικής νόσου. Ιδανικά δύο εβδομάδες με ένα μήνα πριν την έναρξη της θεραπείας με βιολογικό παράγοντα θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί εμβολιασμός έναντι της εποχιακής γρίπης, του πνευμονιοκόκκου και του έρπητα ζωστήρα (σε άτομα άνω των 50 ετών).

### **Κίνδυνος για ανάπτυξη φυματίωσης υπό anti-TNFα**

Οι αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης του όγκου αυξάνουν τον κίνδυνο για αναζωπύρωση λανθάνουσας λοίμωξης (LTBI) από το *M. Tb*. Αυτό είναι γνωστό ήδη από το 2002, όταν αναλύθηκαν τα στοιχεία για 147.000 ασθενείς που είχαν λάβει ή βρίσκονταν υπό αγωγή με Infliximab, τον πρώτο anti-TNFα που κυκλοφόρησε. Από αυτούς τους ασθενείς 70 ανέπτυξαν ενεργό φυματίωση, μετά από θεραπεία διάρκειας 12 εβδομάδων. Σε 48 ασθενείς διαγνώσθηκε ενεργός φυματίωση μετά από τρεις ή και λιγότερες εγχύσεις. Σαράντα ασθενείς είχαν εξωπνευμονική φυματίωση (17 είχαν διάχυτη νόσο, 11 φυματιώδη λεμφαδενίτιδα, 4 περιτοναϊκή νόσο, 2 υπεζωκοτική φυματίωση, και από ένας ασθενής είχαν αντίστοιχα μηνιγγική, εντερική, παρασπονδυλική, οστική, γεννητικών οργάνων και κύστεως φυματίωση). Από τους 70 ασθενείς οι 64 προέρχονταν από χώρες με χαμηλή επίπτωση της νόσου. Η αναφερόμενη συχνότητα φυματίωσης σε ασθενείς που βρίσκονταν σε αγωγή με Infliximab ήταν υψηλότερη από τη συχνότητα των ευκαιριακών λοιμώξεων. Επίσης, ήταν υψηλότερη από την επίπτωσή της στον εκάστοτε γηγενή πληθυσμό. Σε αυτή τη μελέτη προτάθηκε για πρώτη φορά να γίνεται έλεγχος για LTBI σε ασθενείς που πρόκειται να ξεκινήσουν θεραπεία με Infliximab. (53)

Παρόμοια αποτελέσματα και συστάσεις αναφέρονται σε σειρά μελετών που δημοσιεύθηκαν τα επόμενα χρόνια.(54-61) Φαίνεται, ότι ο κίνδυνος για αναζωπύρωση της νόσου είναι μεγαλύτερος υπό αγωγή με Infliximab και adalimumab σε σύγκριση με αυτόν του etanercept.(53-56)

Οι περισσότερες από τις μελέτες που προαναφέρθηκαν συγκρίνουν την επίπτωση της φυματίωσης σε ασθενείς που λαμβάνουν anti-TNFα σε σχέση με εκείνη του γενικού πληθυσμού. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος ίσως υπερεκτιμά την απόλυτη αύξηση του κινδύνου αφού οι περισσότεροι ασθενείς, υπό αυτήν την αγωγή, έχουν PA η οποία έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση φυματίωσης σε κάποιες(58;62;63), αλλά όχι σε όλες τις μελέτες.(64)

Παρόλα αυτά, οι αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης του όγκου φαίνεται να αυξάνουν τον κίνδυνο για TB περισσότερο από ότι θα μπορούσε να σχετίζεται με την PA καθαυτή. Αυτό περιγράφηκε λεπτομερειακά από στοιχεία νοσηλείας στη Σουηδία από το 1999 ως το 2001 από όπου υπολογίστηκε ο σχετικός κίνδυνος φυματίωσης σε ασθενείς με PA σε

σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό και του κινδύνου για TB σε ασθενείς με PA που βρίσκονταν υπό αγωγή με anti-TNF σε σύγκριση με εκείνους τους ασθενείς με PA που δεν ελάμβαναν αγωγή με τους αναστολείς.(58) Ο σχετικός κίνδυνος για TB μεταξύ των ασθενών με PA που δεν λάμβαναν αγωγή με anti-TNFα σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό ήταν διπλάσιος (2.0, 95% CI 1,2-3,4). Αντίθετα, ο σχετικός κίνδυνος ασθενών με PA που ελάμβαναν αγωγή με αντι-TNF σε σύγκριση με εκείνους τους ασθενείς με PA που δεν βρίσκονταν υπό αγωγή με anti-TNFα ήταν 4πλάσιος (4.0, 95% CI 1,3-12).

### **Κίνδυνος για TB ανάλογα με τον anti-TNFα παράγοντα**

Όσον αφορά τον κίνδυνο αναζωπύρωσης της φυματίωσης παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των anti-TNFα παραγόντων.(65) Ο κίνδυνος για αναζωπύρωση λανθάνουσας φυματίωσης είναι μεγαλύτερος με τα μονοκλωνικά αντισώματα (infliximab, adalimumab) σε σύγκριση με το etanercept (136-144/100.000 και 39/100.000 αντίστοιχα).(53-57;60;66)

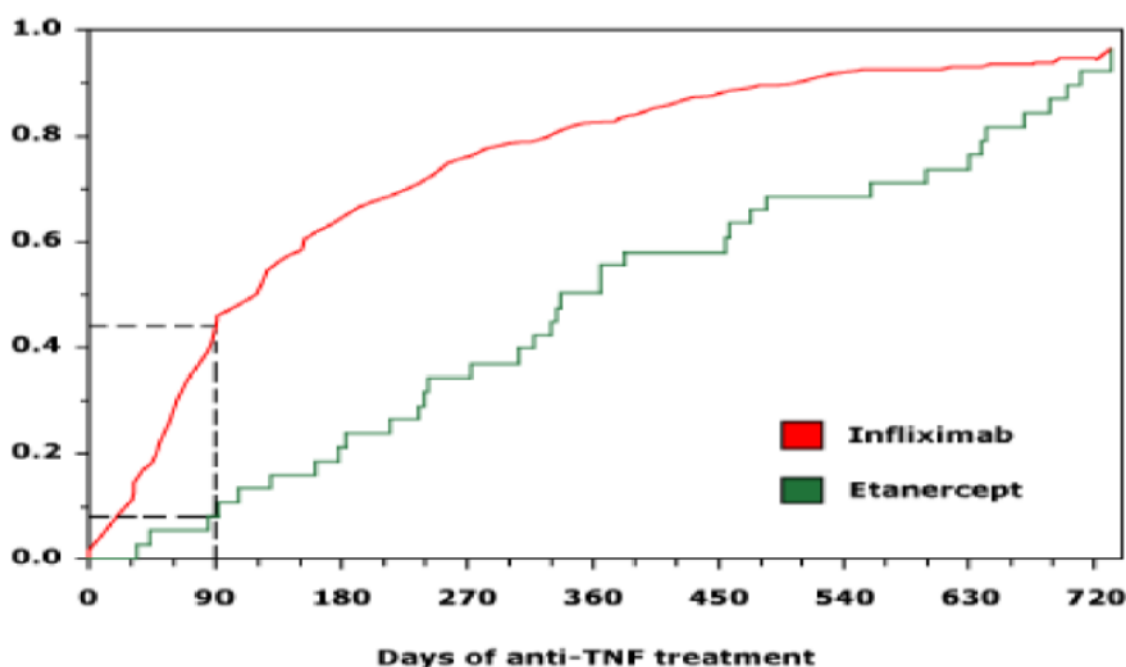
Οι περιπτώσεις φυματίωσης που εμφανίζονται σε μικρό χρονικό διάστημα μετά την έναρξη της αγωγής με τους αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης του όγκου, είναι πιο πιθανό να οφείλονται σε αναζωπύρωση λανθάνουσας φυματίωσης. Οι περιπτώσεις που εμφανίζονται αργότερα, αφορούν είτε καθυστερημένη αναζωπύρωση είτε νέα λοίμωξη από το *M. Tuberculosis* που προκάλεσε άμεσα ενεργό νόσο, ενώ σε άλλες συνθήκες θα εμφανιζόταν αρκετό καιρό μετά τη λοίμωξη.

Σε αρκετές μελέτες έχει παρατηρηθεί επίσης το γεγονός η ενεργός φυματίωση να εμφανίζεται σε συντομότερο χρονικό διάστημα υπό αγωγή με infliximab (12 - 32 εβδομάδες) σε σύγκριση με τη λήψη etanercept (18 - 79 εβδομάδες).(53;56-58;64;66;66;67)Σε μία μελέτη που εκπονήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο και η οποία συνέκρινε το infliximab με το adalimumab και το etanercept, ο μέσος χρόνος μέχρι την εμφάνιση ενεργού φυματίωσης ήταν μικρότερος για το infliximab(5,5 μήνες) σε σύγκριση με το etanercept (13,4 μήνες) και το adalimumab (18,5 μήνες).(66) Οι 13 από τις 40 περιπτώσεις εμφανίστηκαν μετά τη διακοπή της θεραπείας. Ο λόγος στον οποίο οφείλεται ο διαφορετικός χρόνος εμφάνισης της ενεργού TB μετά την έναρξη θεραπευτικής αγωγής με anti-TNF παράγοντες δεν είναι γνωστός, ίσως όμως



η καθυστερημένη εμφάνιση της TB να αντανακλά τη διαφορετική επίδραση κάθε παράγοντα στον κίνδυνο αναζωπύρωσης, μια νέα λοίμωξη ή τα φθίνοντα αποτελέσματα της προφυλακτικής αγωγής με ισονιαζίδη.

Σε άλλη μελέτη, 43% των περιπτώσεων εμφάνισης TB σε ασθενείς που βρίσκονταν υπό αγωγή με infliximab συνέβησαν κατά τις πρώτες 90 ημέρες θεραπείας, γεγονός που συνάδει με αναζωπύρωση λανθάνουσας λοίμωξης. Αντίθετα, οι περιπτώσεις εμφάνισης TB σε ασθενείς που ελάμβαναν etanercept κατανέμονταν ομοιόμορφα καθόλη τη διάρκεια της περιόδου που βρίσκονταν υπό θεραπεία και μόνο 10% συνέβησαν κατά τη διάρκεια των πρώτων 90 ημερών αγωγής.(57) (Εικόνα 5)



**Εικόνα 5.**

**Αθροιστική αναλογία των περιπτώσεων φυματίωσης σε ασθενείς υπό αγωγή με anti-TNFα σε σχέση με τη διάρκεια της αγωγής (US Food and Drug Administration).(53)**

### ***Κλινικά Χαρακτηριστικά της φυματίωσης υπό anti-TNFα***

Η ενεργός φυματίωση που σχετίζεται με τη χρήση αναστολέων του παράγοντα νέκρωσης του όγκου έχει συχνότερα εξωπνευμονική εντόπιση και αφορά περισσότερα όργανα σε σύγκριση με την ενεργό λοίμωξη που χωρίς

τη χρήση anti-TNFα.(65;68-70) Οι ασθενείς αυτοί πιθανόν να μην εμφανίζουν συμπτωματολογία από το αναπνευστικό αλλά να προσέρχονται με άτυπα συμπτώματα (για παράδειγμα πυρετός, κακουχία, νυχτερινοί ιδρώτες, λεμφαδενοπάθεια, βήχας κ.λ.π) με αποτέλεσμα την καθυστερημένη διάγνωση. (Εικόνα 6) Η βιοψία οργάνου-στόχου μπορεί να μην αποκαλύπτει τα τυπικά κοκκιώματα και οι ειδικές χρώσεις μπορεί να είναι αρνητικές λόγω χαμηλού μικροβιακού φορτίου.

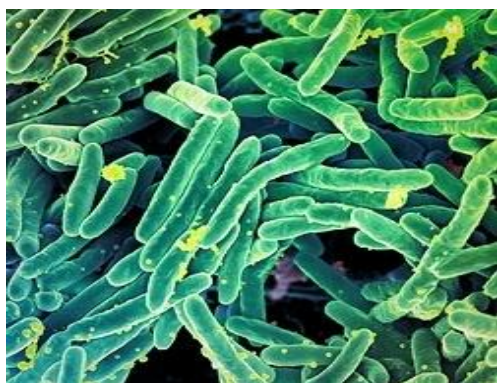


**Εικόνα 6. Διαγνωστικός αλγόριθμος της φυματίωσης σε ασθενείς υπό anti-TNFα θεραπεία (2)**

## Γ. Η λοίμωξη από το μυκοβακτηριδίο της φυματίωσης

### Μικροβιολογία του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης

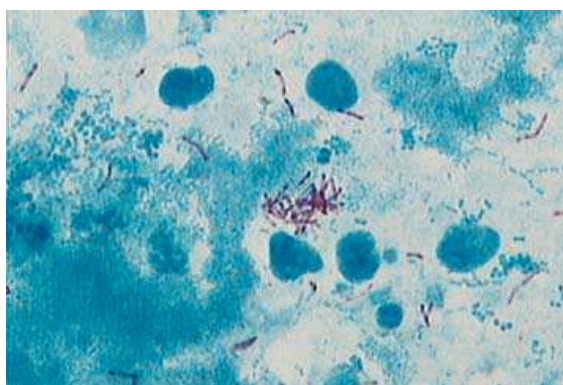
Το μυκοβακτηριδίο της φυματίωσης είναι ακίνητο, ασπορογόνο, μη ελυτροφόρο, υποχρεωτικά αερόβιο, ενδοκυττάριο βακτηρίδιο (συνήθως στα μακροφάγα) κι έχει σχήμα ευθείας ή ελαφρώς κεκαμμένης ράβδου με μήκος 2 - 4 μm και πλάτος 0,2 – 0,5 μm.(71) (Εικόνες 7 και 8)



**Εικόνα 7.**

### **M.tuberculosis σε φωτογραφία απήλεκτρονικόκ μικροσκόπιο**

(Scanning electron micrograph of *Mycobacterium tuberculosis*.  
Credit :National Institute of Allergy and Infectious Disease)



**Εικόνα 8.**

### **Χρώση του M.tuberculosis σε πτύελα με Ziehl-Neelsen.**

Δεν μπορεί να χρωσθεί με τις συνήθεις τεχνικές (χρώση Gram), εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας του τοιχώματός του σε λιπίδια, οπότε δεν

ανήκει ούτε στα Gram (+), ούτε στα Gram (-). Για την ανίχνευσή του χρησιμοποιείται κυρίως η χρώση Ziehl-Neelsen που το κατατάσει στα οξεοάντοχα βακτήρια.(72)

Παρότι τα μυκοβακτηρίδια εμπειρικά δεν ανήκουν στα Gram (+), αφού δεν συγκρατούν την κρυσταλλική ιώδη χρώση, ταξινομούνται ως οξεοάντοχα Gram (+) βακτήρια, επειδή δεν διαθέτουν εξωτερική κυτταρική μεμβράνη.

Το *M. Tb* μπορεί να καλλιεργηθεί στο μικροβιολογικό εργαστήριο σε ειδικά θρεπτικά υλικά, έχει όμως εξαιρετικά μεγάλο χρόνο διπλασιασμού, σχεδόν 15 με 20 ώρες, όταν άλλοι μικροοργανισμοί διαιρούνται σε λίγα μόνο λεπτά.(73;74) Η ανίχνευση και ταυτοποίηση του *MTb* γίνεται και με μοριακές τεχνικές οι οποίες στοχεύουν στο 16srRNA του μυκοβακτηριδίου. Μοριακή διάγνωση εφαρμόζεται τόσο άμεσα σε βιολογικά υλικά όσο και σε καλλιέργημα. Αποτελεί δε και τον καλύτερο τρόπο ανίχνευσης αντοχής σε χορηγούμενα για τη φυματίωση φάρμακα.

### **Μετάδοση**

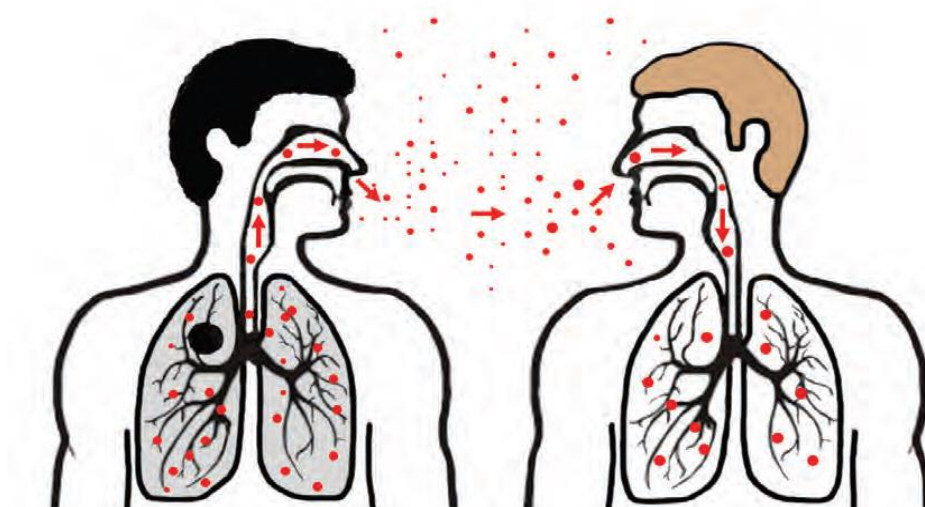
Η φυματίωση είναι μία σχεδόν αποκλειστικά αερογενώς μεταδιδόμενη λοίμωξη, ειδικά μετά από τον σχεδόν πλήρη έλεγχο της φυματίωσης βοείου τύπου που ακολούθησε την παστερίωση του γάλακτος τη δεκαετία του 1960 και τη μείωση του αριθμού των νοσούντων ζώων. Η εκτίναξη από το στόμα ή τη μύτη των εκκρίσεων του αναπνευστικού συστήματος ασθενούς με ενεργό φυματίωση του πνεύμονα ή του λάρυγγα γίνεται υπό τη μορφή σταγονιδίων καθώς ο ασθενής βήχει, ππρνίζεται, ομιλεί ή τραγουδά. (Εικόνα 9)

Μετά την εκτόξευση, το υγρό στοιχείο εξατμίζεται κι έτσι απομένει το στερεό υλικό, ο πυρήνας του σταγονιδίου (droplet nuclei), που έχει διάμετρο 1 – 5 μm και μεταφέρει τα μυκοβακτηρίδια (από 1-3 μυκοβακτηρίδια σε κάθε πυρήνα). Κατά την ήρεμη αναπνοή παράγονται επίσης σταγονίδια αλλά το μέγεθός τους δεν τα καθιστά ικανά να μεταφέρουν μυκοβακτηρίδια ούτε να εγκατασταθούν στην επιφάνεια των κυψελίδων. Ανάλογα με το περιβάλλον τα σωματίδια μπορούν να παραμείνουν στον αέρα για ώρες. Η μετάδοση συμβαίνει όταν κάποιο άτομο εισπνεύσει τους πυρήνες των σταγονιδίων που περιέχουν τα μυκοβακτηρίδια και αυτοί μέσω του στόματος ή της μύτης, του ανώτερου αναπνευστικού και των βρόγχων φτάσουν στις κυψελίδες. Η

εισβολή ενός και μόνο μυκοβακτηριδίου στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη.(75;76)

Οι πυρήνες που παράγονται από ανθρώπους με παραγωγικό βήχα και θετικό επίχρισμα σιέλου για οξεοάντοχους βακίλους περιέχουν περισσότερα μυκοβακτηρίδια. Ο αριθμός των μικροοργανισμών εξαρτάται επίσης από την εκπνευστική δύναμη του βήχα καθώς και από την παρουσία σπηλαίων στους πνεύμονες.(77) Έχει υπολογιστεί ότι οι οζώδεις βλάβες στους πνεύμονες περιέχουν  $10^2$ - $10^4$  βακίλους ενώ οι κοιλότητες μπορεί να περιέχουν  $10^8$ - $10^9$ . Όταν ένα φυμάτιο με τυροειδή νέκρωση ραγή προς έναν βρόγχο, αμέτρητα μυκοβακτηρίδια αποκτούν πρόσβαση στους μεγάλους αεραγωγούς και διαμέσου αυτών στο εξωτερικό περιβάλλον.(78;79) Η πιθανότητα μετάδοσης της φυματίωσης εξαρτάται από την συγκέντρωση των μικροοργανισμών που αποβάλλονται στον αέρα, τη διάρκεια έκθεσης του ασθενούς καθώς και από το ανοσολογικό status του ασθενούς.

Επειδή το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης είναι υποχρεωτικά αερόβιο, οι εισπνεόμενοι μικροοργανισμοί μπορούν και επιβιώνουν στις καλά αεριζόμενες ζώνες των τελικών κυψελίδων. Αν και η μερική πίεση του οξυγόνου είναι υψηλότερη στους άνω λοβούς των πνευμόνων, οι πυρήνες των σταγονιδίων εναποτίθενται συχνότερα στους κάτω λοβούς ως αποτέλεσμα της βαρύτητας.(80)



**Εικόνα 9. Μετάδοση της φυματίωσης.***Η φυματίωση μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο διαμέσου του αέρα. Στην εικόνα οι κόκκινες κουκίδες αναπαριστούν τους πυρήνες των σταγονιδίων που περιέχουν τα μυκοβακτηρίδια (75)*

## **Ανοσολογική απάντηση**

### **Μη ειδική ανοσολογική απάντηση**

Η μη ειδική ανοσολογική απάντηση ξεκινά όταν τα δενδριτικά κύτταρα και τα μακροφάγα των πνευμόνων εγκυστώνουν τα μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης στις κυψελίδες.(81) Η εγκαθίδρυση της λοίμωξης εξαρτάται από την λοιμοτοξικότητα των μικροοργανισμών και την μικροβιοκτόνο ικανότητα των μακροφάγων. Το μυκοβακτηρίδιο έχει αναπτύξει συγκεκριμένους μηχανισμούς ώστε να αποφεύγει την καταστροφή μέσα στα φαγοσώματα των κυψελιδικών μακροφάγων. Η ωρίμανση των φαγοσωμάτων είναι μια διαδικασία που περιλαμβάνει την οξίνιση και την επακόλουθη σύντηξη με τα λυσοσώματα. Το όξινο pH παρέχει το βέλτιστο περιβάλλον για την αποδόμηση των μικροβίων. Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης έχει την ικανότητα να σταματά την ωρίμανση των φαγοσωμάτων σε ένα πρώιμο στάδιο και να επιτρέπει με τον τρόπο αυτό τη συνεχή του ενδοκυττάρια ανάπτυξη. Το μυκοβακτηρίδιο μπορεί στη συνέχεια να διαδοθεί μέσω του λεμφικού ιστού στους νεφρούς, τον εγκέφαλο, τα οστά και στους άνω πνευμονικούς λοβούς, δηλαδή σε θέσεις με ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες για την ανάπτυξή του. Ο πολλαπλασιασμός των μυκοβακτηριδίων συνεχίζεται στα μολυσμένα όργανα μέχρι να αναπτυχθεί η κυτταρική ανοσία.(82)

### **Κυτταρική ανοσολογική απάντηση**

Το μη ενεργοποιημένο μακροφάγο έχει ασθενή αντιμικροβιακή δράση και επιτρέπει τον λογαριθμικό ενδοκυττάρια αναδιπλασιασμό των μυκοβακτηριδίων. Τα μολυσμένα μακροφάγα μετακινούνται προς τους περιοχικούς λεμφαδένες, όπου στην μεγάλη πλειοψηφία των περιπτώσεων η ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας οδηγεί στον περιορισμό της λοίμωξης. Παρά ταύτα, περίπου 5% των ασθενών δεν είναι σε θέση να παράξουν μία σθεναρή κυτταρική απάντηση και αναπτύσσουν ενεργό φυματίωση ένα έως δύο χρόνια μετά την αρχική λοίμωξη.(83)

Οι ασθενείς που βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο να αναπτύξουν ενεργό νόσο είναι εκείνοι που πάσχουν από διαβήτη, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, HIV, πνευμονοκονίαση, κακοήθειες της κεφαλής και του

τραχήλου, οι μεταμοσχευμένοι ασθενείς καθώς και εκείνοι που βρίσκονται υπό αγωγή με κορτικοστεροειδή ή άλλα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα (π.χ anti-TNF $\alpha$ ). (83)

Η απόκριση της κυτταρικής ανοσίας ξεκινά στους λεμφαδένες. Οι αντιγονικοί επίτοποι του μυκοβακτηριδίου συνδέονται με μόρια του μείζονος σύστηματος ιστοσυμβατότητας τάξεως II (MHC-II) μέσα στα φαγοσώματα και παρουσιάζονται στην επιφάνεια του μακροφάγου. Η αντιγονική διέγερση οδηγεί στην ενεργοποίηση των T κυττάρων. Με την επακόλουθη μετανάστευση στο πνευμονικό παρέγχυμα, τα ενεργοποιημένα T κύτταρα αναγνωρίζουν τα μολυσμένα μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μακροφάγων και την έναρξη διαμόρφωσης του κοκκιώματος.(84) Τόσο τα CD4<sup>+</sup> όσο και τα CD8<sup>+</sup>T κύτταρα συμβάλουν στην ανοσολογική απόκριση. Τα CD4<sup>+</sup> κύτταρα, τα οποία αναγνωρίζουν τα αντιγόνα μέσω των MHC-II μορίων, έχουν σπουδαιότερο ρόλο και κάποια από αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε λύση των μολυσμένων μακροφάγων.(85) Τα CD8<sup>+</sup>T κύτταρα λειτουργούν ως κυτταροτοξικά δραστικά κύτταρα του MHC-I και συμμετέχουν στην ανοσιακή απόκριση σε μεταγενέστερα στάδια της λοίμωξης. Άλλα T κύτταρα, όπως τα γδ κύτταρα και τα CD1 κύτταρα, θεωρείται ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο, χωρίς όμως αυτός να είναι πλήρως τεκμηριωμένος.(84) Τέλος, τα NK κύτταρα έχουν κυτταροτοξική δράση, και παρέχουν την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης. Η εξάλειψη των κυττάρων, που παρέχουν το κατάλληλο ενδοκυττάριο περιβάλλον για την ανάπτυξη των μυκοβακτηριδίων, αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή.

Οι κυτταροκίνες που παράγονται από τα T κύτταρα έχουν σπουδαίο ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, στο σχηματισμό καθώς και στη λύση του κοκκιώματος της φυματίωσης. Η διέγερση των T-βοηθητικών κυττάρων (Th1), υποκατηγορίας των CD4<sup>+</sup> κυττάρων, οδηγεί στην απελευθέρωση ιντερφερόνης- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) και TNF. Αυτές οι κυτταροκίνες είναι υπεύθυνες για τον μετασχηματισμό των μακροφάγων/μονοκυττάρων σε εξειδικευμένα ιστιοκύτταρα με εξειδικευμένη βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση. Τα διεγερμένα μακροφάγα προκαλούν τη δημιουργία παραγώγων του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το

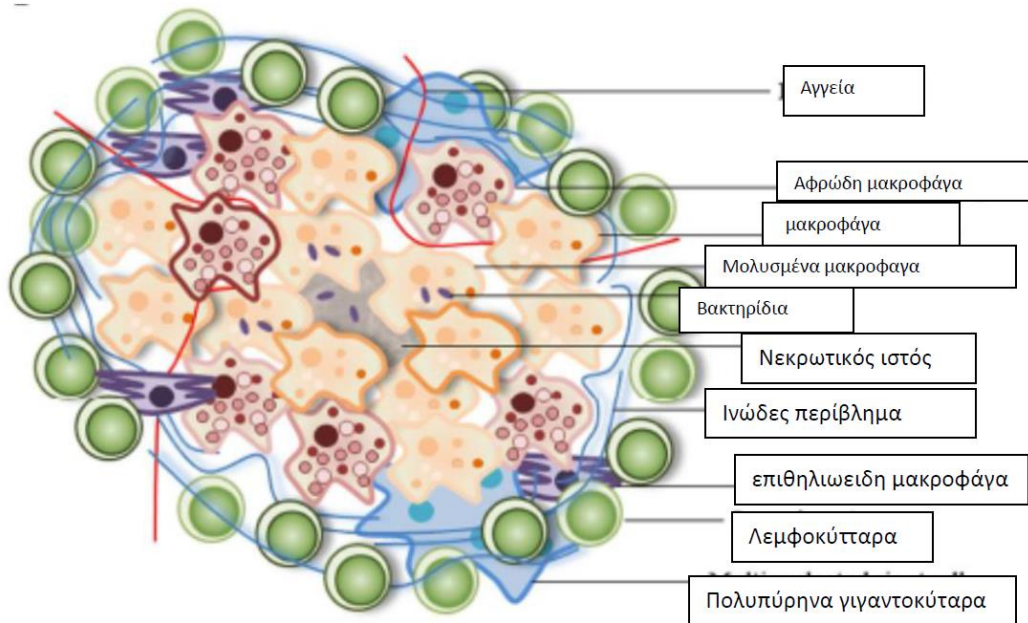


οξειδίο του αζώτου, με τα οποία τα κύτταρα μάχονται τα ενδοκυττάρια βακτηρίδια. Επιπλέον, με την επίδραση των T κυττάρων, τα ενεργοποιημένα μακροφάγα δημιουργούν και οργανώνουν τα κοκκιώματα για τον περιορισμό της μυκοβακτηριδιακής λοίμωξης. Η έκκριση ιντερλευκίνης (IL-12) από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα NK κύτταρα ενισχύουν περαιτέρω την ανοσολογική απόκριση μέσω αύξησης του πληθυσμού των Th1 CD4<sup>+</sup> κυττάρων.(85)

### **Το κοκκίωμα**

Όπως ήδη ειπώθηκε η πρόγνωση της νόσου εξαρτάται από την ικανότητα του ξενιστή να εξουδετερώσει τον βάκιλο. Η αναπνευστική οδός είναι η κύρια οδός της μόλυνσης. Η νόσος ξεκινά όταν σταγονίδια από ασθενή με ενεργό νόσο φθάσουν στο αναπνευστικό σύστημα κάποιου υγιούς ατόμου. Αυτά τα σταγονίδια περιέχουν μικρό αριθμό μυκοβακτηριδίων που εισέρχονται στους πνεύμονες όπου αρχικά μολύνουν κυψελιδικά μακροφάγα, τύπου II πνευμονοκύτταρα και πολυμορφοπύρηνα ουδερερόφιλα.(86) (Εικόνα 10)

Στους περισσότερους ανθρώπους, η μόλυνση δεν προκαλεί κάποιο πρόβλημα στην υγείας τους, αφού τα βακτηρίδια έχουν αναπτύξει την ικανότητα να ζουν σε ισορροπία με την ανοσολογική απάντηση. Ο βάκιλος είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός που μπορεί για δεκαετίες να συνυπάρχει με τον ξενιστή χωρίς να προκαλεί κλινική νόσο, με την αναζωπύρωση ωστόσο να συμβαίνει μόνο όταν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή κατασταλεί.



**Εικόνα 10.**

**Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών στοιχείων του κοκκιώματος (87)**

Τα μολυσμένα μακροφάγα στους πνεύμονες στρατολογούν διάφορα κύτταρα, όπως περισσότερα μακροφάγα στην περιοχή της λοίμωξης, απελευθερώνοντας διάφορες κυτταροκίνες. Τα δενδριτικά κύτταρα έχουν σημαντικό ρόλο αφού παρουσιάζουν τα αντιγόνα στα Τ κύτταρα των λεμφαδένων, όπου μια Τκυτταρική απάντηση μπορεί κατόπιν να αναπτυχθεί. Αυτά τα γεγονότα οδηγούν στην δημιουργία ενός κοκκιώματος, μία σημαντική δομή για τη φυματίωση. Αυτή η δομή σχηματίζεται από τον ξενιστή για να περιορίσει τη μόλυνση. Όμως τα μυκοβακτηρίδια παραμένουν μέσα στο κοκκίωμα σε λανθάνουσα κατάσταση ακόμα και για δεκαετίες. Μετέπειτα ενεργοποιούνται σε 10% των ασθενών με λανθάνουσα φυματίωση. Ο θάνατος των μολυσμένων κυττάρων οδηγεί στη δημιουργία μιας νεκρωτικής ζώνης στο κέντρο του κοκκιώματος, το οποίο τελικά αποσυντίθεται απελευθερώνοντας τα μυκοβακτηρίδια στον πνεύμονα και κατ' επέκταση στο περιβάλλον. Το κοκκίωμα δημιουργεί ένα μικροπεριβάλλον όπου η λοίμωξη μπορεί να περιοριστεί. Επίσης, όμως παρέχει στον βάκιλο ένα καταφύγιο όπου μπορεί να επιζήσει, διαμορφώνοντας την ανοσολογική απόκριση με στόχο την επιβίωση για δεκαετίες χωρίς ιδιαίτερες βλάβες. (88;89)

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για την εγκαθίδρυση της λοίμωξης είναι η ισορροπία μεταξύ φλεγμονωδών και αντι-φλεγμονωδών

κυτταροκινών που παράγονται για να μειώσουν και να ελέγξουν τον βακτηριδιακό πολλαπλασιασμό. Ο TNF και η INF- $\gamma$  είναι ιδιαίτερα σημαντικοί παράγοντες για την δημιουργία και διατήρηση του κοκκιώματος, ενώ η IL-10 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην ανοσιακή απάντηση.(90-92)

Το κοκκίωμα είναι μια καλά οργανωμένη δυναμική δομή με κύτταρα της ανοσίας σε διάφορα στάδια διαφοροποίησης. Αποτελείται από μολυσμένα και μη μακροφάγα, προερχόμενα από το περιφερικό αίμα, αφρώδη μακροφάγα, επιθηλιοειδή κύτταρα (διαφοροποιημένα μακροφάγα), πολυπύρηννα γιγαντοκύτταρα (γνωστά ως γιγάντια κύτταρα Langhans), ινοβλάστες καθώς και από T- και B- λεμφοκύτταρα.(93;94)

Τα κοκκιώματα συρρέουν, ενώνονται και σχηματίζουν ορατές μάζες που υφίστανται νέκρωση μέσα σε μονήρεις βλάβες ή βλάβες με τήξη. Μακροσκοπικά η βλάβη είναι ωχρή, κιτρινωπή και σκληρή και για το λόγο περιγράφεται ως «τυροειδής νέκρωση». Η τυροειδής νέκρωση είναι πλούσια σε μυκοβακτηριδιακά λιπίδια, πρωτεΐνες και κυτταρικά συντρήματα. Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης μπορεί να επιβιώσει μέσα σε αυτές τις συμπαγείς τυροειδείς βλάβες αν και ο πολλαπλασιασμός τους εμποδίζεται από το μειωμένο οξυγόνο στο περιβάλλον, το ελαττωμένο pH και τη συγκέντρωση λιπαρών οξέων. Στα ανοσοεπαρκή άτομα η λοίμωξη σταματά σε αυτό το στάδιο, γεγονός που συμβαίνει σε 95% των περιπτώσεων λοίμωξης. Αυτοί οι ασθενείς έχουν λανθάνουσα φυματίωση και είναι ασυμπτωματικοί. Όμως, οι βάκιλλοι δεν έχουν εξοντωθεί και ο κίνδυνος για αναζωπύρωση παραμένει για δεκαετίες μετά την αρχική λοίμωξη.(95;96)

Τα τυρώδη κοκκιώματα είναι τυπικά της φυματίωσης. Αυτές οι δομές δημιουργούνται από επιθηλιοειδή κύτταρα τα οποία περιβάλλονται από κυτταροβριθή νεκρωτική περιοχή που στο χείλος της έχει T- και B – κύτταρα. Άλλες μορφές κοκκιωμάτων περιλαμβάνουν τα ινώδη κοκκιώματα, τα νεκρωτικά ουδετεροφιλικά κοκκιώματα καθώς και τα μη νεκρωτικά κοκκιώματα που αποτελούνται κυρίως από μακροφάγα με λίγα λεμφοκύτταρα.(97;98)

Με τα κοκκιώματα σχετίζονται επίσης κάποιοι σωροί λεμφικών κυττάρων που οργανώνονται όπως στα οζώδη κέντρα των λεμφαδένων. Αυτές οι δομές φαίνεται να επαρκούν για τη διέγερση των T-κυττάρων ενώ άλλα λεμφικά όργανα, όπως οι λεμφαδένες και ο σπλήνας, δεν φαίνεται να

έχουν ουσιαστικό ρόλο στην αντιμυκοβακτηριδιακή ανοσολογική απόκριση.(99) Είναι πιθανό η εγγενής ανοσία να συνεισφέρει στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των βακτηριδίων.(100) Όμως τα T-κύτταρα, που ενεργοποιούνται μετά την έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο είναι απαραίτητο συστατικό για την ανοσολογική απάντηση.(101)

Όπως έχει δείχθει σε μελέτες σε ποντικούς και zebra-fish η δημιουργία του κοκκιώματος είναι μια δυναμική διαδικασία. Η δημιουργία του αρχίζει με τη συνάθροιση διαφόρων υποκατηγοριών κυττάρων από τη σειρά των μακροφάγων/μονοκυττάρων τα οποία υπόκεινται σε μορφολογικές αλλαγές. Τότε τα T-κύτταρα στρατολογούνται γρήγορα για το σχηματισμό του κοκκιώματος. Τα μακροφάγα φαίνεται να παραμένουν σχετικά σταθερά στη δομή αυτή ενώ τα T-κύτταρα εμφανίζουν μεγάλη κινητικότητα, αν και παραμένουν στο κοκκίωμα πιθανόν λόγω της αλληλεπίδρασής τους με τα μακροφάγα. Σε κάποιες από τις μελέτες φάνηκε πως τα μακροφάγα σε διάφορα στάδια μεταναστεύουν στην περιφέρεια έξω από το κοκκίωμα. Τα ειδικά για το μυκοβακτηρίδιο T-κύτταρα ήταν λίγο περισσότερα από άλλα T-κύτταρα κατά τη μετανάστευση στις εν λόγω βλάβες και η παραγωγή κυτταροκινών ήταν μέτρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρουσίαση και αναγνώριση των αντιγόνων είναι περιορισμένη μέσα στο κοκκίωμα.(100-105)

Στη δημιουργία του κοκκιώματος συμμετέχουν πολλές διαφορετικές χυμοκίνες. Κάποιες παράγονται από τα επιθηλιακά κύτταρα του αναπνευστικού συστήματος και άλλες από τα κύτταρα που διαμεσολαμβάνουν την ανοσολογική απάντηση. Ειδικότερα, οι χυμοκίνες που συνδέονται στον υποδοχέα CCR2(CCL2/MCP-1, CCL12 και CCL13) συσχετίζονται με την πρώιμη στρατολόγηση των μακροφάγων. Η οστεοποντίνη (osteopontin), που παράγεται από τα μακροφάγα και τα λεμφοκύτταρα, προάγει την στρατολόγηση και συγκόληση αυτών των κυττάρων. Οι CCL19 και CCL21 σχετίζονται με την κινητοποίηση και πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων που παράγουν INF- $\gamma$ . Η CXCL13 συμμετέχει στην στρατολόγηση B-κυττάρων και στον σχηματισμό οζωδών δομών.(106) Σε ελλειμματικά για τον TNF- $\alpha$  ποντίκια, η έκφραση των CC και των CXC χυμοκινών απορυθμίζεται σε μεταγραφικό επίπεδο, και η έλλειψη αυτών των χυμοκινών εμποδίζει την στρατολόγηση των μακροφάγων και των CD4+ T-κυττάρων, δεικνύοντας με

τον τρόπο αυτό το σημαντικότερο ρόλο του TNF στο σχηματισμό του κοκκιώματος.(21) Στις πλέον σημαντικές κυτταροκίνες για το κοκκίωμα συγκαταλέγονται η INF- $\gamma$  και ο TNF. Η INF- $\gamma$ , που παράγεται από τα CD4+ (Th1) και CD8+ T cells καθώς και NK κύτταρα, ενεργοποιεί τα μακροφάγα και επάγει την παραγωγή της NO-συνθετάσης και την εξάλειψη των μυκοβακτηριδίων. Ο TNF είναι μια προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που παράγεται από τα μακροφάγα και τα CD4+ T cells (Th1) κύτταρα. Ο TNF επάγει την παραγωγή χημοκινών, ενεργοποιεί τα μακροφάγα και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο όχι μόνο στο σχηματισμό αλλά και στη διατήρηση του κοκκιώματος.(107)

Τα κοκκιώματα με την τυροειδή νέκρωση μπορεί να επουλωθούν ή αντίθετα να τηχθούν και να σχηματίσουν κοιλότητα λόγω της δράση πρωτεϊνών, νουκλεασών και λιπασών των μακροφάγων. Σε αντίθεση με τα συμπαγή κοκκιώματα, η υγροποιημένη νέκρωση επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης.(108) Ο περιορισμός του μυκοβακτηριδίου στα κοκκιώματα είναι ατελής. Αν οι βάκιλοι μετακινηθούν από την άκρη της τυροειδούς νέκρωσης στον περιβάλλοντα κοκκιωματώδη ιστό, θα ξεκινήσει για μία ακόμα φορά ο ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός στα ασθενώς ενεργοποιημένα μακροφάγα των ευάλωτων οργανισμών. Αυτά τα γεμάτα με μυκοβακτηρίδια μακροφάγα θανατώνονται μαζί με τους περιβάλλοντες ιστούς με την επιβραδυνόμενου τύπου αντίδραση υπερευαισθησίας. Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, το αυξανόμενο αντιγονικό φορτίο προκαλεί ιστική νέκρωση, τη δημιουργία σπηλαίων με διάβρωση των τοιχωμάτων των βρόγχων και τελικά την διάδοση των μικροοργανισμών. Αντίθετα, αν τα μυκοβακτηρίδια διαφύγουν της τυροειδούς νέκρωσης και φαγοκυτταρωθούν από ισχυρώς ενεργοποιημένα μακροφάγα, το κοκκίωμα σταθεροποιείται με αποτέλεσμα τον περιορισμό των βακίλλων.

Συνεπώς η παθογένεση της φυματίωσης περιλαμβάνει 4 κύρια στάδια (Εικόνα 11):

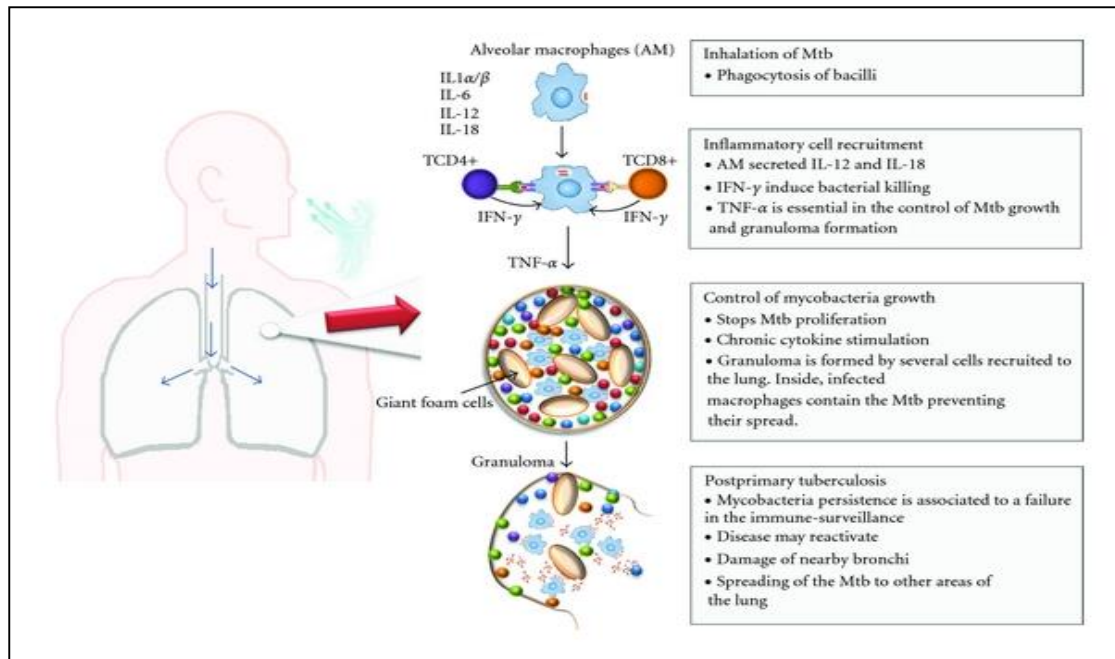
A) **Την εισπνοή των μυκοβακτηριδίων** ακολουθεί η αλληλεπίδρασή τους με τα μακροφάγα μέσω κυτταρικών υποδοχέων και η ενδοκυττάρωσή τους (φαγοκυττάρωση).

**Β) Ενεργοποίηση μακροφάγων** (περιλαμβάνεται η παραγωγή RNI και ROI). Η επιτυχία των μηχανισμών αυτών να εξουδετερώσουν το μυκοβακτηρίδιο εξαρτάται από παράγοντες που αφορούν είτε τον παθογόνο μικροοργανισμό είτε τον ξενιστή. Τα ζώντα μυκοβακτηρίδια πολλαπλασιάζονται εντός των μακροφάγων και επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Το τοπικό, φλεγμωνώδες μικροπεριβάλλον επάγει την στρατολόγηση διαφόρων κυττάρων, όπως μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα, στο σημείο της φλεγμονής. Τα υψηλά επίπεδα του TNF-α συνεισφέρουν στον περιορισμό του πολλαπλασιασμού των μυκοβακτηριδίων καθώς και στο σχηματισμό του κοκκιώματος.

**Γ) Έλεγχος του πολλαπλασιασμού των μυκοβακτηριδίων – Κοκκιώματα (Λανθάνουσα φυματίωση):** Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, συμπεριλαμβανομένων των T-κυττάρων, οργανώνονται σε χαρακτηριστικές δομές που ονομάζονται κοκκιώματα. Χαρακτηριστικό σε αυτές τις δομές είναι η παρουσία αφρωδών κυττάρων που προκύπτουν από τη διαφοροποίηση των ενεργοποιημένων μακροφάγων. Στα κοκκιώματα σταματά ο πολλαπλασιασμός των μυκοβακτηριδίων και περιορίζονται οι βάκιλλοι εντός αυτών εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη διασπορά τους. Ο περιορισμός αυτός οδηγεί στην σταθερή κατάσταση που ονομάζεται λανθάνουσα φυματίωση.

**Δ) Μεταπρωτοπαθής φυματίωση:** Όταν η επιβίωση των βακίλλων συνδυαστεί με καταστολή του ανοσολογικού συστήματος αυξάνεται ο κίνδυνος αναζωπύρωσης της λανθάνουσας φυματίωσης. Με τον τρόπο αυτό επάγεται η αλλοίωση των βρόγχων και τελικά η διασπορά των μυκοβακτηριδίων σε άλλα τμήματα του πνεύμονα αλλά και στο περιβάλλον με συνέπεια τη μετάδοση της νόσου.(109)

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι οι βάκιλλοι καθευατού δεν είναι τοξικοί. Το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης δεν εκκρίνει καμία εξωτοξίνη ή ενδοτοξίνη. Αντίθετα η βλάβη διαμεσολαβείται από την ανοσιακή απόκριση του ξενιστή στα φυματινικά προϊόντα.(108;110) Αν και παράγονται αντισώματα έναντι του μυκοβακτηριδίου, αυτά δεν φαίνεται να διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο.(111)



**Εικόνα 11.**

**Τα τέσσερα διακριτά στάδια της παθογένεσης της φυματίωσης(109)**

## Δ. Λανθάνουσα φυματίωση

Η φυσική ιστορία της φυματίωσης ξεκινά με την εισπνοή των μυκοβακτηριδίων της φυματίωσης. Με τον τρόπο αυτό αρχίζει μία περίοδος πολλαπλασιασμού και διασποράς των μικροοργανισμών, η οποία ακολουθείται από τον περιορισμό των βακίλλων μέσω της ανοσολογικής απάντησης. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η ασυμπτωματική λανθάνουσα φυματίωση (LTBI). Η LTBI ορίζεται ως μία κατάσταση εμμένουσας επιβίωσης των μυκοβακτηριδίων χωρίς κανένα κλινικό σημείο ή απεικονιστικό εύρημα ενδεικτικό ενεργού νόσου.(112;113)

Μέχρι σήμερα δεν είναι δυνατόν να διαγνώσουμε απευθείας την λανθάνουσα φυματίωση. (Πίνακας 2) Για το λόγο αυτό η διάγνωση γίνεται με την απόκριση σε *in vivo* ή *in vitro* διέγερση από αντιγόνα του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης με τη χρήση της δερματικής φυματινοαντίδρασης (TST) και των δοκιμασιών απελευθέρωσης INF-γ (IGRAs.) 5%-15% των ατόμων με λανθάνουσα φυματίωση θα νοσήσουν από ενεργό φυματίωση κατά τη διάρκεια της ζωής τους.(114) Το ποσοστό αυτό είναι υψηλότερο στους ανοσοκατεσταλμένους.

	<b>Ενεργός</b>	<b>Λανθάνουσα</b>
Υπολογιζόμενοι αριθμοί, 2012	8,6 εκατ. άτομα/έτος, 1,3 εκατ.θάνατοι/έτος	<b>2 δισεκατ. άτομα</b>
Κλινική εικόνα	Συνήθως συμπτωματική. Εξαρτάται από την πρωτοπαθή νόσο αλλά συνήθως περιλαμβάνει επίμονο βήχα, πυρετό, νυχτερινούς ιδρώτες, απώλεια βάρους, κακουχία, δύσπνοια, αιμόπτυση, θωρακικό άλγος, πνευμονία	Ασυμπτωματική
Ακτινογραφία θώρακα	Με παθολογικά ευρήματα	Φυσιολογική απεικόνιση

**Πίνακας 2. Βασικές διαφορές μεταξύ Λανθάνουσας και Ενεργού Φυματίωσης (115)**

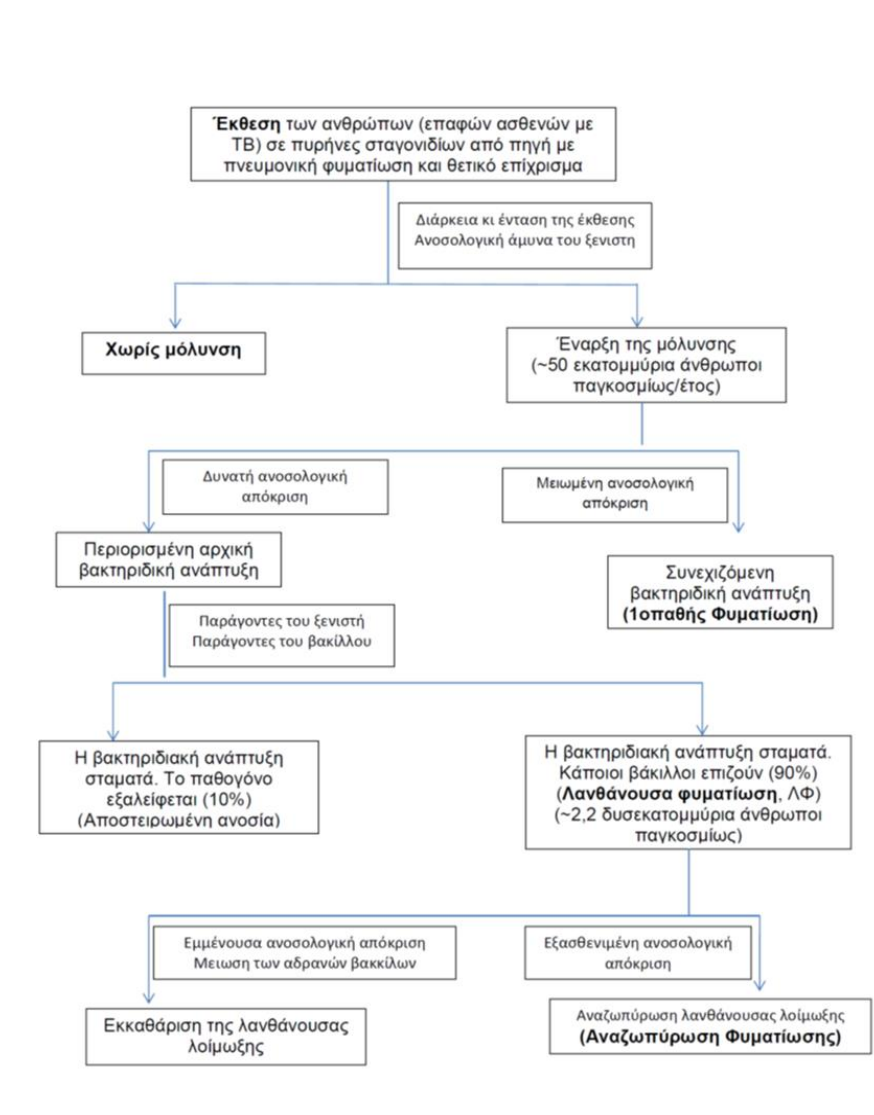


## Παθογένεση της λανθάνουσας φυματίωσης

Μετά την εισπνοή των μυκοβακτηριδίων, οι αποκρίσεις την εγγενούς ανοσίας, οι οποίες περιλαμβάνουν κυψελιδικά μακροφάγα και γιγαντοκύτταρα, ξεκινούν τη διαδικασία για τον περιορισμό της μόλυνσης. Κάποιοι άνθρωποι δεν μολύνονται, καθώς τα βακτηρίδια εξοντώνονται, ενώ σε άλλους εδραιώνεται η λοίμωξη.(116) (Εικόνα 12)

Ο πολλαπλασιασμός των βακίλλων στα μακροφάγα και τους περιοχικούς λεμφαδένες οδηγεί τόσο στην λεμφική όσο και στην αιματογενή διασπορά, με τον ενοφθαλμισμό μυκοβακτηριδίων σε πολλαπλά όργανα, από όπου τελικά μπορεί να προκύψει η εξωπνευμονική νόσος. Ο περιορισμός των βακίλλων μέσα στα μακροφάγα ή εξωκυττάρια μέσα στα κοκκιώματα, μειώνει τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό και την ιστική καταστροφή, με αποτέλεσμα μια δυναμική ισοροπία μεταξύ του παθογόνου μικροοργανισμού και του ξενιστή. Η δυναμική αυτή ισοροπία περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ανοσολογικής απόκρισης, τόσο προστατευτικής όσο και παθογενετικής, καθώς και ένα ευρύ φάσμα βακτηριδιακής ενεργότητας. Αυτή η ατέρμονη διαδικασία απαιτεί ποικίλες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και μικροοργανισμού, που χαρακτηρίζονται ως λανθάνουσα νόσος, όταν κυριαρχεί η ανοσολογική απάντηση του ξενιστή, και ως ενεργός νόσος όταν ο πολλαπλασιασμός των μυκοβακτηριδίων υπερβαίνει την ουδό που απαιτείται για την πρόκληση συμπτωμάτων.(117)

Στοιχεία από ερευνητικές μελέτες δεικνύουν πως οι φλεγμονώδεις απαντήσεις του ξενιστή, κυρίως με την ιντερλευκίνη-1β, είναι πιθανόν να ενισχύουν ουσιαστικά τον πολλαπλασιασμό των μυκοβακτηριδίων. Αυτό γνωρίζουμε ότι συμβαίνει στην ενεργό φυματίωση, αλλά είναι πιθανό να ισχύει και για τη λανθάνουσα νόσο.(118) Επιπρόσθετα, εξωκυττάριοι βάκιλλοι ίσως παραμένουν ενεργοί σε ένα είδος βιοφιλμ και με τον τρόπο αυτό να παρακάμπτουν την άμυνα του ξενιστή. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο όρος εμμένουσα (σε αντιδιαστολή με τον όρο λανθάνουσα) ίσως να περιγράφει πληρέστερα την πολυπλοκότητα του φαινομένου.(119)



**Εικόνα 12. Η φυσική εξέλιξη των γεγονότων και το αποτέλεσμα σε ανοσοεπαρκή ασθενή μετά την έκθεση σε πυρήνες σταγονιδίων με μυκοβακτηρίδια από ασθενή με TB και θετικό επίχρισμα σιέλου. (116)**

Κάθε έτος, ~ 50 εκατομ. άνθρωποι παγκοσμίως μολύνονται με *M.Tb*. Πλήρη εξάλειψη των μυκοβακτηριδίων επιτυγχάνουν μόνο 10% των ασθενών ενώ σε περίπου ~ 90% των μολυσμένων ατόμων η βακτηριδιακή ανάπτυξη σταματά αλλά κάποιοι βάκιλλοι επιζούν και οδηγούν στη λανθάνουσα φυματίωση. Η μείωση των αδρανών βακίλλων σε ασθενείς με λανθάνουσα φυματίωση μπορεί να επισπευθεί με χορήγηση ισονιαζίδης για 9 μήνες. Τα νέα εμβόλια στις κλινικές δοκιμές εμποδίζουν ή καθυστερούν την αναζωπύρωση της λανθάνουσας λοίμωξης.

## Επιδημιολογία και ομάδες κινδύνου

Τα επιδημιολογικά εργαλεία που διαθέτουμε δεν είναι αρκετά για να υπολογίσουμε τον παγκόσμιο επιπολασμό της λανθάνουσας φυματίωσης. Κάποια μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν περίπου μία δεκαετία πριν υπολόγισαν ότι περίπου το 1/3 του παγκόσμιου πληθυσμού (> 2 δισεκατομμύρια άνθρωποι) έχουν λανθάνουσα φυματίωση.(120)

Καθώς η φαρμακευτική αγωγή έχει διαδοθεί τα τελευταία δεκαπέντε έτη και οι συνθήκες διαβίωσης έχουν βελτιωθεί παγκοσμίως είναι πιθανό ο ετήσιος κίνδυνος της λοίμωξης να έχει μειωθεί σε πολλές χώρες. Για το λόγο αυτό είναι δύσκολο να υπολογιστεί σήμερα, με ακρίβεια ο επιπολασμός της νόσου. Οι ασθενείς με ενεργό φυματίωση του αναπνευστικού συστήματος που δεν έχουν λάβει την κατάλληλη αγωγή είναι η πηγή της μετάδοσης ουσιαστικά για όλες τις νέες μολύνσεις από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Σχεδόν 1/3 των οικείων τους, που έρχονται σε επαφή μαζί τους, μολύνονται.(114) Οι παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης σε οικιακές επαφές περιλαμβάνουν την σοβαρή λοίμωξη του ασθενούς 0, τις μεγάλες περιόδους έκθεσης στον ασθενή αυτό, κακό εξαερισμό και περιορισμένη υπεριώδη ακτινοβολία κατά την διάρκεια έκθεσης στον ασθενή 0. Η αναζωπύρωση της λανθάνουσας λοίμωξης είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία των νέων περιπτώσεων φυματίωσης, ιδιαίτερα σε χώρες με χαμηλή επίπτωση της νόσου.(121) Η πιθανότητα εξέλιξης της λανθάνουσας νόσου σε ενεργό φυματίωση εξαρτάται από παράγοντες που σχετίζονται με το μυκοβακτηρίδιο, τον ξενιστή και το περιβάλλον. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι υπάρχουν διαφορές μεταξύ της ικανότητας διαφορετικών στελεχών του μυκοβακτηριδίου να προκαλούν λοίμωξη, αλλά τα κλινικά και επιδημιολογικά στοιχεία που υποστηρίζουν την παραπάνω άποψη είναι λίγα. Τα αρχικό βακτηριδιακό φορτίο, όπως εκφράζεται από την δριμύτητα της νόσου του ασθενούς 0 καθώς και η εγγύτητα τως επαφών, συσχετίζεται άμεσα με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Η νόσος αναπτύσσεται σε μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ βρεφών και πολύ νεαρών παιδιών που έχουν λανθάνουσα νόσο σε σύγκριση με μεγαλύτερα παιδιά που έχουν λανθάνουσα λοίμωξη. Όταν ένα παιδί περάσει τα 5 έτη, η ηλικία φαίνεται να μην συσχετίζεται ιδιαίτερα με τον κίνδυνο για νόσο.(114) Η άμβλυνση της κυτταρικής ανοσίας από τη λοίμωξη με τον ιό της ανθρώπινης

ανοσοανεπάρκειας,(122) τους αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης του όγκου,(123) τα γλυκοκορτικοειδή(124) και την μεταμόσχευση οργάνου(125) οργάνου ή την μεταμόσχευση αιματολογικών ασθενών(126) αυξάνουν ιδιαίτερα τον κίνδυνο για την αναζωπύρωση της νόσου. Η τελικού σταδίου νεφρική νόσος(127) καθώς και η πνευμονοκοκκίαση(128) επίσης αυξάνουν τον κίνδυνο προόδου από την λανθάνουσα στην ενεργό νόσο. Άλλες ομάδες ατόμων υψηλού κινδύνου, είτε επειδή έχουν αυξημένο επιπολασμό είτε επειδή έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της ενεργού νόσου, περιλαμβάνουν τους τρόφιμους φυλακών,(129) τους χρήστες παράνομων ουσιών,(129) τους άστεγους, (130) τους μετανάστες που έχουν πρόσφατα μετοικήσει από χώρες με υψηλό επιπολασμό της φυματίωσης,(131) τους ηλικιωμένους,(132) τους εργαζόμενους στο χώρο της υγείας και τους φοιτητές ιατρικής,(133) τους ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (134) καθώς και εκείνους που πρόσφατα εμφάνισαν θετική δοκιμασία φυματίνης ενώ παλαιότερα ήταν αρνητική.(133)

Μπορούμε να διακρίνουμε εκείνους τους ανθρώπους οι οποίοι έχουν αυξημένο κίνδυνο να μολυνθούν από το *M. Tuberculosis*. Τα άτομα αυτά έχουν αυξημένο κίνδυνο σε σχέση με εκείνα τα άτομα που δεν έχουν τα χαρακτηριστικά ή ιδιότητες που θα περιγράψουμε παρακάτω :

- ❖ Στενή επαφή με ασθενή με γνωστή ή και υπο διερεύνηση ενεργό φυματίωση.
- ❖ Άτομα γεννημένα σε χώρες με υψηλή επίπτωση της φυματίωσης (για παράδειγμα Αφρική, Ασία, Ανατολική Ευρώπη, Λατινική Αμερική και Ρωσία).
- ❖ Άτομα που ταξιδεύουν σε χώρες με υψηλό επιπολασμό της νόσου ιδιαίτερα αν τα ταξίδια είναι αυξημένης χρονικής διάρκειας ή συχνά.
- ❖ Τρόφιμοι ή εργαζόμενοι σε ιδρύματα (για παράδειγμα φυλακές, άσυλα αστέγων, γηροκομεία).
- ❖ Εργαζόμενοι σε υπηρεσίες υγείας όπου υπάρχει επαφή με ασθενείς ύποπτους για λοίμωξη από τον βάκιλλο του Koch.
- ❖ Πληθυσμοί που έχουν αυξημένη επίπτωση για λανθάνουσα ή ενεργό φυματίωση, όπως αλκοολικοί, χρήστες ουσιών, χωρίς πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας ή εκείνοι με χαμηλό εισόδημα.

- ❖ Βρέφη, παιδιά και ενήλικες που έρχονται σε επαφή με ενήλικες οι οποίοι έχουν αυξημένο κίνδυνο ενεργού ή λανθάνουσας φυματίωσης.(135)

Αντίστοιχα, μπορούμε να διακρίνουμε εκείνους τους ανθρώπους που έχουν χαρακτηριστικά τα οποία προσδίδουν αυξημένο κίνδυνο για εξέλιξη της νόσου σε ενεργό μορφή σε σύγκριση με εκείνους που δεν έχουν αυτά τα χαρακτηριστικά. Ακόμα μπορούμε να διακρίνουμε εκείνους με αυξημένο κίνδυνο για πτωχά αποτελέσματα (για παράδειγμα μηνιγγίτιδα, διεσπαρμένη νόσο ή θάνατος ) σε περίπτωση ενεργού φυματίωσης :

- ❖ Ασθενείς με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας.
- ❖ Βρέφη και παιδιά ηλικίας μικρότερης των 5 ετών.
- ❖ Ασθενείς που βρίσκονται υπό αγωγή με ανοσοκατασταλτικά όπως οι ανταγωνιστές του TNF-α, συστηματικά κορτικοστεροειδή ισοδύναμα με  $\geq 15$  mg πρεδνιζολόνης ανά ημέρα ή ανοσοκατασταλτική φαρμακευτική αγωγή μετά από μεταμόσχευση οργάνου.
- ❖ Άτομα που έχουν πρόσφατα μολυνθεί από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ( έως και δύο χρόνια πριν).
- ❖ Άτομα που δεν έχουν λάβει αγωγή ή έχουν λάβει ανεπαρκή αγωγή για ενεργό φυματίωση, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με ινωτικές αλλοιώσεις στην ακτινογραφία θώρακα συμβατές με παρελθούσα ενεργό φυματίωση.
- ❖ Ασθενείς με πνευμονοκονίαση, σακχαρώδη διαβήτη, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, λευχαιμία, λέμφωμα ή κακοήθεις όγκους κεφαλής, τραχήλου, πνευμόνων.
- ❖ Άτομα που έχουν υποβληθεί σε γαστρεκτομή ή ειλεονησιτιδική παράκαμψη.
- ❖ Άτομα που ζυγίζουν λιγότερο από 90% του ιδανικού σωματικού βάρους.
- ❖ Καπνιστές, αλκοολικοί καθώς και χρήστες ουσιών.
- ❖ Πληθυσμοί που έχουν αυξημένη επίπτωση για ή ενεργό φυματίωση, όπως εκείνοι χωρίς πρόσβαση σε υπηρεσίες υγείας ή εκείνοι με χαμηλό εισόδημα. (136)

## **Διάγνωση LTBI**

Για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης δεν υπάρχει μέθοδος αναφοράς. Η δερματική αντίδραση στην φυματίνη (Tuberculin Skin Test / TST) και οι μέθοδοι απελευθέρωσης ιντερφερόνης- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$  Release Assays / IGRAs) μετρούν έμμεσα τη λοίμωξη από το μυκοβακτηρίδιο με το να αναγνωρίζουν την απόκριση των T-κυττάρων, η οποία στην ουσία αποκαλύπτει την ευαισθητοποίηση του ξενιστή έναντι των αντιγόνων του βακίλου.(137) Οι παραπάνω μέθοδοι διάγνωσης είναι καθολικά αποδεκτές αλλά ατελείς.(138)

## **Δερματική δοκιμασία φυματίνης**

Η δοκιμασία αυτή αναπτύχθηκε από τον R.Koch το 1890 όμως η ενδοδερμική μέθοδος που χρησιμοποιούμε σήμερα περιγράφηκε το 1912 από τον Charles Mantoux, έναν Γάλλο γιατρό που χρησιμοποίησε τη δουλειά του Koch και του Clemens von Pirquet(139) για να δημιουργήσει την τεχνική του. Η TST είναι μέθοδος φθηνή και χρησιμοποιείται ευρέως, όμως έχει πτωχή ειδικότητα σε πληθυσμούς που έχουν εμβολιαστεί με BCG, αλληλεπιδρά με μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια και έχει πτωχή ευαισθησία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.(137)

Η αντίδραση που παρατηρείται μετά την ενδοδερμική έγχυση της φυματίνης είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της καθυστερημένης, κυτταρικής αντίδρασης υπερευαισθησίας. Τα T-κύτταρα που έχουν προηγουμένως ευαισθητοποιηθεί από παλαιότερη λοίμωξη, επιστρατεύονται στο δέρμα στην περιοχή της έγχυσης και παράγουν λεμφοκίνες. Αυτές οι λεμφοκίνες επάγουν τη σκληρία μέσω τοπικής αγγειοδιαστολής,οιδήματος, εναπόθεσης ινικής και τη στρατολόγηση άλλων φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή. Τα χαρακτηριστικά της αντίδρασης στη φυματίνη περιλαμβάνουν την καθυστερημένη έναρξη και πορεία της, που φτάνει το μέγιστο 24 ώρες μετά την έγχυση των αντιγόνων,(139) τη σκληρία(140) και περιστασιακά την εμφάνιση φουσαλίδων και νέκρωση.(141)

Η TST εμφανίζεται ως θετική μετά από διάστημα περίπου 6 έως 8 εβδομάδων μετά την έναρξη της λοίμωξης.(142-144) Αν και η TST είναι μια φθηνή μέθοδος, χωρίς ανάγκη εργαστηριακής ανάλυσης και τα όρια για την ερμηνεία της σαφή, θα πρέπει να γίνεται από έμπειρο προσωπικό.(145) Οι ασθενείς πρέπει 48 έως 72 ώρες μετά την έγχυση να επισκεφθούν ξανά την

ιατρική μονάδα όπου έγινε η έγχυση ώστε να γίνει η εκτίμηση του αποτελέσματος.(146) Η μέθοδος έχει χαμηλή ειδικότητα, με αποτέλεσμα ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε άτομα που για παράδειγμα έχουν εμβολιαστεί με BCG ή έχουν εκτεθεί σε μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια.(147;148) Σε κάποιους πληθυσμούς έχει χαμηλή ευαισθησία, με αποτέλεσμα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε ασθενείς, όπως ανοσοκατεσταλμένους με HIV, με συστηματικές λοιμώξεις, με χρόνια νεφρική νόσο, με επεμβάσεις στο γαστρεντερικό σύστημα, σε υποσιτισμένους, σε ανθρώπους που έχουν εμβολιαστεί με ζώντες μικροοργανισμούς καθώς και σε εκείνους που συστηματικά λαμβάνουν ανοσοκατασταλικά φάρμακα.(76;149) Η ευαισθησία ποικίλλει επίσης ανάλογα με τα όρια της σκληρίας που έχουν θεσπιστεί ως θετικά.(150) (Πίνακας 3)

Ευαισθησία της TST σε ασθενείς με σκληρία > 0 mm	
Όριο cut-off	Ευαισθησία %
≥ 5 mm	95-99
≥ 10 mm	91-95
≥ 15 mm	67-80

### Πίνακας 3. Ευαισθησία της TST όταν η σκληρία > 0 mm (151)

Αναφορικά με τα αποτελέσματα της TST μπορούν να είναι ψευδώς τόσο θετικά όσο και αρνητικά. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα παρατηρούνται σε: λοίμωξη από μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια, προηγούμενο εμβολιασμό με BCG, λανθασμένη μέθοδος διενέργειας της TST, λανθασμένη εκτίμηση του αποτελέσματος και χρήση λάθους αντιγόνου.(152) Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται μεταξύ 71-82%. Η ειδικότητα στο στο γενικό πληθυσμό είναι 85-90%, μη εμβολιασμένους προσεγγίζει 99% ενώ για τους εμβολιασμένους με BCG είναι χαμηλή περίπου 60%. Η απουσία μεθόδου αναφοράς για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης έχει οδηγήσει σε αδυναμία υπολογισμού με ακρίβεια της ειδικότητας της μεθόδου.(151;153)

Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα παρατηρούνται σε: ηλικία < 6 μηνών, ηλικία > 65 ετών, μειωμένη κυτταρική ανοσία (π.χ. λοίμωξη με HIV/AIDS), μυελουπερπλαστικά σύνδρομα, οξεία ή πρόσφατη ιογενής

λοίμωξη π.χ. ερυθρά, ιλαρά, λοιμώδη μονοπυρήνωση και οστρακιά, ανοσοποίηση με εμβόλια ζώντων μικροοργανισμών τις τελευταίες 6 εβδομάδες (π.χ. ιλαρά, πολιομυελίτιδα, κίτρινος πυρετός, παρωτίτιδα, ερυθρά), σοβαρές καταβολικές νόσοι, συστηματική λήψη κορτικοστεροειδών (>15 mg πρεδνιζολόνης ή ισοδύναμου) ή αγωγή με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, πνευμονική φυματίωση σε προχωρημένο στάδιο, φυματίωση του κεντρικού νευρικού συστήματος ή άλλων οργάνων, σαρκοείδωση, υποσιτισμός, διάστημα μέχρι να αναπτυχθεί η ανοσιακή απάντηση στη λοίμωξη από μυκοβακτηρίδιο, λάθη κατά τη διενέργεια της δοκιμασίας (υποδόρια έγχυση, λάθος ποσότητα, κακή συντήρηση/φύλαξη της φυματίνης) και τέλος λάθη κατά την μέτρηση (πολύ νωρίς ή πολύ αργά). (154-162)

### **Μέθοδοι απελευθέρωσης Ιντερφερόνης-γ (Interferon-γ Release Assays/IGRAs)**

Το 2001, η QuantiFERON-TB (QFT) έγινε η πρώτη IGRA που εγκρίθηκε από τον FDA ως δοκιμασία / μέσο για τη διάγνωση της λοίμωξης από το *M. Tb.*(154) Αυτή η τεχνική χρησιμοποιούσε μια δοκιμασία ενζυμοσυσζευγμένης ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για να μετρήσει το ποσό της ιντερφερόνης-γ που απελευθερωνόταν ως απόκρισης στη PPD σε σύγκριση με κάποιον πληθυσμό ελέγχου. Το CDC εξέδωσε κατευθυντήριες οδηγίες για τη χρήση της το 2003.(155) Όμως η ειδικότητα της QFT ήταν μικρότερη από εκείνης της TST παρά τη χρήση αντιγόνων του *M. avium* ως έλεγχο (control) για την ευαισθητοποίηση σε μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδιο και ορό ως αρνητικό control.(156) Η QFT έπαψε να είναι εμπορικά διαθέσιμη από το 2005. Για να βελτιωθεί η ειδικότητα δημιουργήθηκαν νέες IGRAs.

Αυτές οι μέθοδοι εκτιμούν την απάντηση σε συνθετικά αλληλοεπικαλυπτόμενα πεπτίδια τα οποία αντιπροσωπεύουν πρωτείνες του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, όπως το early secretory antigenic target-6 (ESAT-6) και η culture filtrate protein 10 (CFP-10). Αυτές οι πρωτείνες είναι παρούσες σε όλα τα στελέχη του *M. tuberculosis* αλλά απουσιάζουν από όλα τα στελέχη του BCG και από τα περισσότερα μη φυματιώδη μυκοβακτηρίδια.(148) Έτσι, ως αντιγόνα για τις μεθόδους, αυτές οι πρωτείνες αυξάνουν την ειδικότητα σε σχέση με την TST. Όμως, η ESAT-6 και η CFP-10 είναι παρούσες στο *M. kansasii*, στο *M. szulgai*, και στο *M. marinum* και η ευαισθητοποίηση σε αυτούς τους μικροοργανισμούς μπορεί να συνεισφέρει



στην απελευθέρωση IFN- $\gamma$  ως απάντηση σε αυτά τα αντιγόνα, οδηγώντας με τον τρόπο αυτό σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα τις IGRAs. Επειδή η ESAT-6 και η CFP-10 αναγνωρίζονται από λιγότερα T-λεμφοκύτταρα και επάγουν λιγότερη απελευθέρωση IFN- $\gamma$  σε σύγκριση με την TST, μία πιο ευαίσθητη ELISA από εκείνη που χρησιμοποιούνταν για την QFT ήταν απαραίτητη για να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις της IFN- $\gamma$  και οι αποκρίσεις στην ESAT-6 και την CFP-10.

Το 2005, το QuantiFERON-TB Gold test (QFT-G) (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) έγινε η δεύτερη IGRA που εγκρίθηκε από τον FDA ως συμπληρωματική μέθοδος για τη διάγνωση της λοίμωξης από το *M. tuberculosis*.(157;158) Το ίδιο έτος οι κατευθυντήριες οδηγίες του CDC για την QFT-G ανέφεραν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλες τις περιπτώσεις που συστήνεται η TST, συμπεριλαμβανομένων της διερεύνησης ατόμων που ήρθαν σε επαφή με ασθενείς με ενεργό φυματίωση, σε μετανάστες καθώς και για διαδοχικές εξετάσεις σε προγράμματα ελέγχου λοιμώξεων (για παράδειγμα σε εργαζόμενους στις υπηρεσίες υγείας).(158) Για να μετρήσουν οι IGRAs την απελευθέρωση ιντερφερόνης- $\gamma$  με ακρίβεια ήταν απαραίτητο ένα φρέσκο δείγμα αίματος που να περιείχε ζώντα λευκά αιμοσφαίρια. Αυτή η ανάγκη περιόριζε τη χρήση των πρώτων IGRAs σε εργαστήρια όπου εκπαιδευμένο προσωπικό θα μπορούσε να επεξεργαστεί τα δείγματα μέσα σε λίγες ώρες από τη συλλογή τους. Η QuantiFERON-TB Gold In-Tube test (QFT-GIT) (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) δημιουργήθηκε για να άρει αυτόν ακριβώς τον περιορισμό. Το 2007 η QFT-GIT έγινε η τρίτη IGRA που εγκρίθηκε από τον FDA.(159)

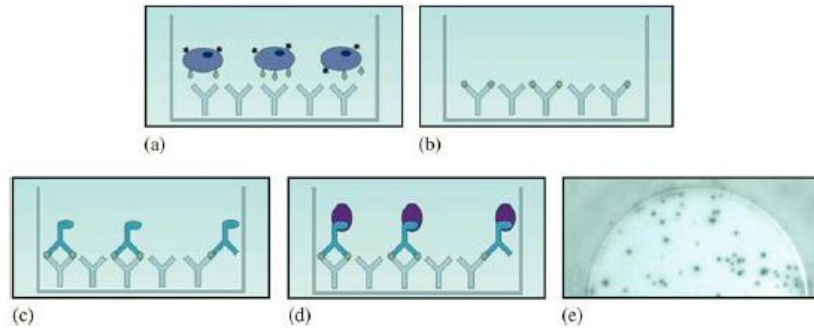
Το 2008 η T-Spot έγινε η τέταρτη IGRA που εγκρίθηκε από τον FDA.(160) Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί μια δοκιμασία ενζυμοσυζευγμένης ανοσοκηλίδας (enzyme-linked immunospot assay / ELISpot) για να ανιχνεύσει κύτταρα που παράγουν IFN- $\gamma$  (όπως αντιπροσωπεύονται ως κηλίδες στα δοκιμαστικά βιοθρία της μεθόδου) μετά τη διέγερση από τα ειδικά αντιγόνα (ESAT-6 και CFP-10). Ο FDA, έχει εγκρίνει τόσο την QFT-GIT όσο και την T-Spot ως in vitro διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση της λοίμωξης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης.(159;160) Αμφότερες οι μέθοδοι έχουν εγκριθεί ως έμμεσες μέθοδοι ανίχνευσης της λοίμωξης από το *M. tuberculosis*, συμπεριλαμβανομένης της λοίμωξης που μπορεί να οδηγήσει σε ενεργό

νόσο, όταν χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με πιθανούς παράγοντες κινδύνου, απεικονιστικά ευρήματα και κλινικά σημεία. Και οι τρεις μέθοδοι (QFT-GIT, T-Spot, και TST) ανιχνεύουν την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά με διαφορετικό τρόπο.

Οι διαθέσιμες μέθοδοι για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, ( για παράδειγμα στην ειδικότητα και στην ευαισθησία, στα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται, στον τρόπο διενέργειας ). (Πίνακας 4, Εικόνες 13 και 14) (150)

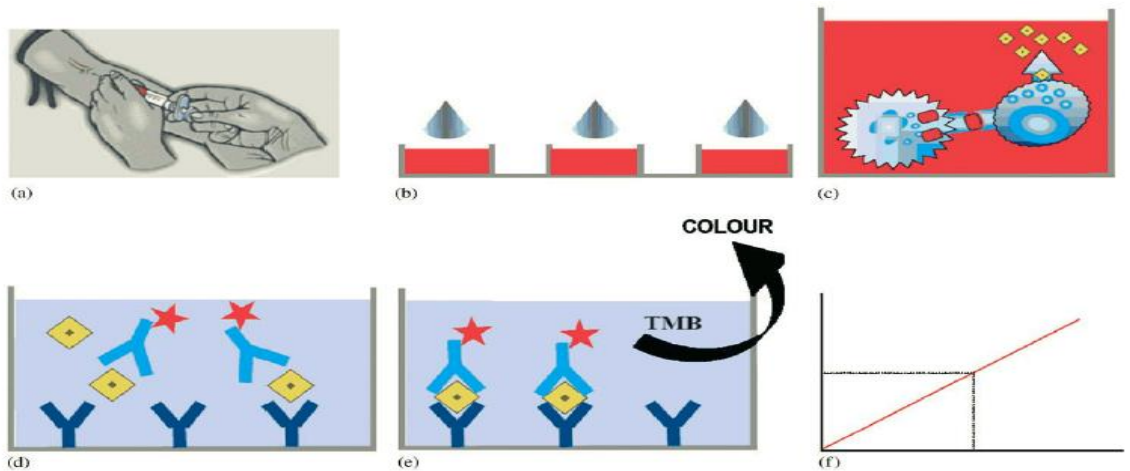
	<b>TST</b>	<b>Quantiferon</b>	<b>T-SPOT.TB</b>
<b>Αντιγόνα</b>	Κεκαθαρμένη φυματίνη(ποικίλα αντιγόνα)	<b>ESAT6, CFP10, TB 7.7</b> (ειδικά, απουσιάζουν από το BCG και τα περισσότερα NTM)	<b>ESAT6, CFP10</b> (ειδικά, απουσιάζουν από το BCG και τα περισσότερα NTM)
<b>Διαδικασία Μεθόδου</b>	Δερματική δοκιμασία(υποδορίως, 2 επισκέψεις)	Δοκιμασία απελευθέρωσης INF-γ σε πλήρες αίμα (1 επίσκεψη)	Μέθοδος κηλίδας με περιφερικά μονοκύτταρα (1 επίσκεψη)
<b>Ανάγκη εργαστηρίου</b>	Όχι, κλινική διαδικασία	Απαραίτητο (φρέσκο αίμα, άμεση επεξεργασία)	Απαραίτητο (άμεσα διαχωρισμός κυττάρων)
<b>Κόστος</b>	Χαμηλό	Υψηλό	Υψηλό
<b>Αλληλεπίδραση με BCG</b>	Ναι	Όχι	Όχι
<b>Φαινόμενο Ενίσχυσης</b>	Ναι	Όχι	Όχι
<b>Επιλογή ορίων</b>	5,10,15 mm, ανάλογα με τον πληθυσμό (αλλαγή ευαισθησίας και ειδικότητας)	Ένα όριο Όχι ξεκάθαρο αν επηρεάζονται ευαισθησία και ειδικότητα	Ένα όριο Όχι ξεκάθαρο αν επηρεάζονται ευαισθησία και ειδικότητα
<b>Ορομετατροπή</b>	Κριτήρια για πρόσφατη μετατροπή	Ελλιπή στοιχεία	Ελλιπή στοιχεία
<b>Λανθάνουσα ή ενεργός φυματίωση</b>	Δεν μπορούν να διακριθούν	Δεν μπορούν να διακριθούν	Δεν μπορούν να διακριθούν
<b>Πρόσφατη ή παρελθούσα έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο</b>	Δεν μπορούν να διακριθούν	Δεν μπορούν να διακριθούν	Δεν μπορούν να διακριθο ύν
<b>Συσχέτιση με Έκθεση στο <i>M.Tb</i></b>	Μέτρια, κυρίως σε ανεμβολίαστους πληθυσμούς	Υψηλή	Υψηλή
<b>Ανοσοκαταστολή</b>	Σημαντική συσχέτιση	Μέτρια συσχέτιση	Μέτρια συσχέτιση
<b>Προχωρημένη ηλικία</b>	Σημαντική συσχέτιση	Μέτρια συσχέτιση	Μέτρια συσχέτιση
<b>Ευαισθησία</b>	71-82%	63-82%	86-93%
<b>Ειδικότητα</b>	Ανεμβολίαστοι: 95-99% Εμβολιασμένοι: χαμηλότερη και ετερογενής	Ανεμβολίαστοι: 98-100% Εμβολιασμένοι: 94-98%	86-100%

**Πίνακας 4. Διαφορές μεταξύ των μεθόδων για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης**



**Εικόνα 13. Βασικές αρχές της T-SPOT.TB.**

α) Στην πλάκα μικροτιτλοδότησης οι μικροκυψελίδες καλύπτονται από μονοκλωνικά αντισώματα. Τα T-κύτταρα που εκκρίνουν ιντερφερόνη-γ προστίθενται και επωάζονται παρουσία μυκοβακτηριδιακών αντισωμάτων. β) Η ιντερφερόνη-γ συνδέεται στα μονοκλωνικά αντισώματα. γ) Ένα δεύτερο συζευγμένο αντίσωμα προστίθεται και ακολουθεί επώαση. δ) προστίθεται το υπόστρωμα και μετά την αλλαγή του χρώματος μπορούμε να μετρήσουμε τις κηλίδες. ε) Κάθε κηλίδα αντιστοιχεί σε T-κύτταρο που έχει απελευθερώσει ιντερφερόνη-γ. (161)



**Εικόνα 14. Βασικές αρχές της Quantiferon.**

α) Πολλαπλά δείγματα πλήρους, μη διαχωρισμένου ολικού περιφερικού αίματος συλλέγονται μετά από φλεβοκέντηση. β) Προστίθενται αντιγόνα (ESAT-6, CFP10) και ακολουθεί ολονύχτια επώαση. γ) τα αντιγονοειδικά T-κύτταρα παράγουν ιντερφερόνη-γ. δ) Συλλέγεται το πλάσμα και επωάζεται με την τεχνική της ELISA. ε) η συνδεδεμένη ιντερφερόνη-γ είναι ισότιμη με την ανάπτυξη χρώματος. στ) Η ιντερφερόνη-γ μετράται σε IU/ml.(161)

### **Έλεγχος για LTBI σε ασθενείς υπό αγωγή με βιολογικούς παράγοντες**

Ο προσυμπτωματικός διαγνωστικός έλεγχος για τη λανθάνουσα φυματίωση είναι υποχρεωτικός πριν από την έναρξη αγωγής με οποιοδήποτε βιολογικό παράγοντα. Περιλαμβάνει τη λήψη λεπτομερούς ιστορικού πιθανής έκθεσης και των παραγόντων κινδύνου για TB (Πίνακας 5), πλήρη αντικειμενική εξέταση, τη δερματική φυματινοαντίδραση (TST) ή / και τις δοκιμασίες απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ (IGRAs) και την απλή ακτινογραφία θώρακα (162;163).

Ο αλγόριθμος για την αντιμετώπιση των ασθενών με ή χωρίς LTBI:

Αν η TST ή/και οι IGRAs είναι αρνητικές, αλλά συνυπάρχουν παράγοντες κινδύνου για TB, συνιστάται η επανάληψή τους. Αν δεν υπάρχουν παράγοντες κινδύνου, ο ασθενής θεωρείται ότι δεν έχει ούτε λανθάνουσα ούτε ενεργό TB (θεωρείται ότι δεν υπάρχει λοίμωξη), και μπορεί να ξεκινήσει άμεσα την θεραπεία με βιολογικό παράγοντα (level of evidence B). Δεν συστήνεται έλεγχος για ανεργία του ανοσοποιητικού συστήματος όταν οι δοκιμασίες βρεθούν αρνητικές. Για τους ασθενείς που έχουν εμβολιαστεί με BCG συνιστάται έλεγχος κατά προτίμηση με IGRAs.

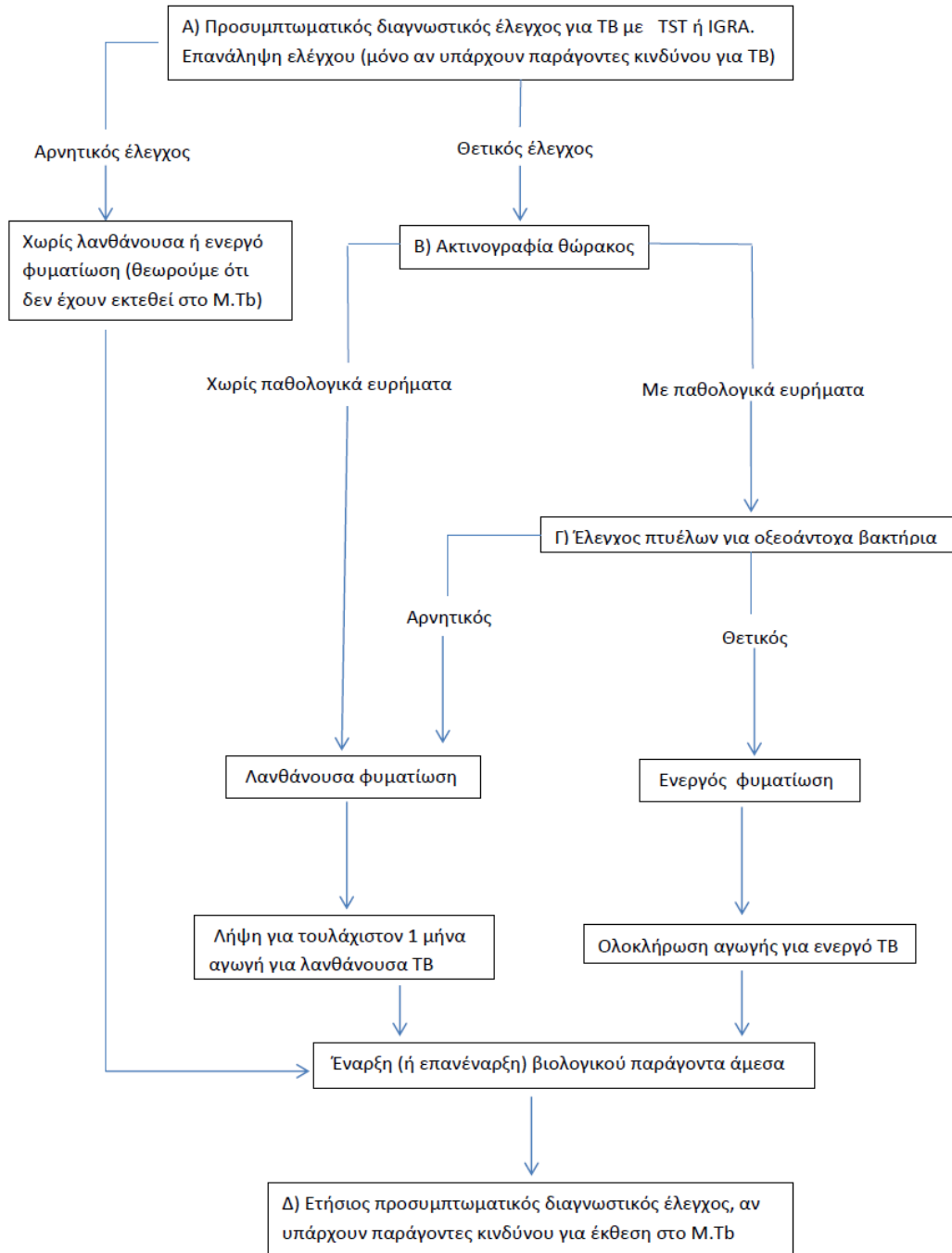
<b>Παράγοντες κινδύνου για TB</b>	
1	Στενή επαφή με άτομα που έχουν γνωστή ή/και υπό διερεύνηση ενεργό φυματίωση
2	Άτομα που έχουν γεννηθεί σε χώρες με αυξημένη επίπτωση ενεργού φυματίωσης (π.χ σε χώρες της Ασίας και της Αφρική)
3	Άτομα που ταξιδεύουν σε χώρες με αυξημένο επιπολασμό ενεργού φυματίωσης (ιδιαίτερα αν τα ταξίδια είναι συχνά ή παρατεταμένα)
4	Εργαζόμενοι και τρόφιμοι σε δομές στις οποίες οι διαμένοντες έχουν αυξημένο κίνδυνο ενεργού φυματίωσης (π.χ φυλακές, δομές φιλοξενίας ηλικιωμένων ή φυλακισμένων)
5	Εργαζόμενοι στον τομέα της υγείας
6	Ειδικές ομάδες: μεχαμηλό εισόδημα, οι μη έχοντες πρόσβαση στις υπηρεσίες υγείας ή οι αλκοολικοί και οι χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών
7	Βρέφη, παιδιά και ενήλικες που έχουν συναναστραφεί άτομα με αυξημένο κίνδυνο για ενεργό ή λανθάνουσα φυματίωση.

### **Πίνακας 5. Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση ενεργού φυματίωσης**

Στην περίπτωση που ο προσυμπτωματικός έλεγχος είναι θετικός συνεκτιμάται το ιστορικό, πιθανά συμπτώματα, ευρήματα από ακτινογραφία θώρακα και καλλιέργειας πτυέλων για μυκοβακτηρίδια, για τη διάκριση μεταξύ ενεργού και λανθάνουσας λοίμωξης. Αν στην ακτινογραφία δεν υπάρχουν παθολογικά ευρήματα, και ο ασθενής είναι ασυμπτωματικός και με αρνητικό ιστορικό, θεωρούμε ότι έχει λανθάνουσα φυματίωση. Αν σε ασυμπτωματικό ασθενή στην ακτινογραφία θώρακα υπάρχουν παθολογικά ευρήματα (όπως ινώδεις αλλοιώσεις στους άνω λοβούς) αλλά η οξεάντοχη χρώση και η καλλιέργεια πτυέλων είναι αρνητική επίσης θεωρούμε ότι ο ασθενής έχει λανθάνουσα φυματίωση. Ασθενείς με ενεργό φυματίωση λαμβάνουν πλήρη αντιφυματική αγωγή πρό της θεραπείας με βιολογικό παράγοντα, ενώ εκείνοι με λανθάνουσα φυματίωση ξεκινούν προφυλακτική αγωγή με INH για 9 μήνες. Μετά τον πρώτο μήνα προφύλαξης είναι δυνατή και η έναρξη αγωγής με βιολογικούς παράγοντες.

Οι ασθενείς με αρνητικές τις προσυμπτωματικές δοκιμασίες πρό της έναρξης της αγωγής είναι πιθανό κατά τη διάρκεια της anti-TNFα θεραπείας να βρεθούν θετικοί σε επανέλεγχο, είτε λόγω έκθεσης στο μυκοβακτηρίδιο (νέα λοίμωξη) ή λόγω βελτίωσης της ανοσιακής τους λειτουργίας (ψευδώς αρνητικός προσυμπτωματικός έλεγχος για λανθάνουσα φυματίωση) ή ο επανέλεγχος να είναι ψευδώς θετικός.

Οι συστάσεις του ACR (εικόνα 15 ) αφορούν τον επανέλεγχο με TST ή IGRAs μόνο εκείνων των ασθενών που ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου.(164)



**ΕΙΚΟΝΑ 15 : Διαγνωστικός αλγόριθμος για LTBI σύμφωνα με τις οδηγίες του ACR 2015**





## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας προοπτικής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της συχνότητας θετικοποίησης των δοκιμασιών ελέγχου της λανθάνουσας φυματίωσης (τόσο της δερματικής φυματινοαντίδρασης όσο και των δύο μεθόδων απελευθέρωσης IFN-γ), κατά τη διάρκεια αγωγής με παράγοντες αναστολής νέκρωσης του όγκου (TNFi), σε ρευματολογικούς ασθενείς με αρνητικό έλεγχο πριν την έναρξη της αγωγής

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Ασθενείς

Από τον Οκτώβριο του 2009 μέχρι και τον Δεκέμβριο του 2013, ελέγχθηκαν για λανθάνουσα φυματίωση (Latent Tuberculosis/LTBI), 247 διαδοχικοί ασθενείς που έπασχαν από διάφορα ρευματικά νοσήματα και οι οποίοι παρακολουθούνται στη Μονάδα Κλινικής Ανοσολογίας-Ρευματολογίας (Β' Παθολογική Κλινική και Ομώνυμο εργαστήριο, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ, Ιπποκράτειο ΓΝΑ) πριν από την έναρξη αγωγής με βιολογικούς παράγοντες. Η μελέτη είχε εγκριθεί από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Ιπποκρατείου ΓΝΑ και όλοι οι ασθενείς υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης πριν από την συμμετοχή τους.

Ο έλεγχος διενεργήθηκε με τη δοκιμασία δερματικής φυματινοαντίδρασης (TST) καθώς και με τις μεθόδους T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd. Oxford, UK) και QuantiFERON-TBGoldInTube (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia), όπως έχει προηγουμένα περιγραφεί.(165;166) Ένα έτος αργότερα 70 από τους 247 ασθενείς (28%) οι οποίοι βρίσκονταν υπό θεραπεία με anti-TNFα παράγοντες και είχαν αρνητικά αποτελέσματα και στις τρεις δοκιμασίες του αρχικού ελέγχου, συμπεριελήφθησαν στην προοπτική αυτή μελέτη για επανέλεγχο,.

Ασθενείς με γνωστό ιστορικό φυματίωσης, με ευρήματα στην ακτινογραφία θώρακα κατά τον αρχικό έλεγχο συμβατά με παλαιά ή ενεργό φυματίωση καθώς και ασθενείς οι οποίοι είχαν λάβει στο παρελθόν αγωγή είτε αντιφυματική (συμπεριλαμβανομένης της ισονιαζίδης) είτε με βιολογικούς παράγοντες, αποκλείστηκαν από την μελέτη.

Ένα έτος μετά την έναρξη αγωγής με anti-TNFα παράγοντες οι ασθενείς υποβλήθηκαν εκ νέου σε έλεγχο για TB και με τις τρεις προαναφερθείσες μεθόδους. (TST, T-SPOT.TB και QuantiFERON-TBGoldInTube) Για όλους τους ασθενείς, τόσο κατά τον αρχικό έλεγχο όσο και ένα έτος αργότερα, συμπληρώθηκε ειδικό ερωτηματολόγιο που περιελάμβανε :

- Δημογραφικά στοιχεία (φύλο, χώρα προέλευσης, τόπος μόνιμης κατοικίας, επαγγελματική απασχόληση)

- Είδος/ διάρκεια ρευματικής πάθησης
- Παρουσία άλλων χρόνιων νοσημάτων και λήψη φαρμάκων για τη θεραπεία αυτών
- Λήψη φαρμάκων για τη θεραπεία της ρευματικής πάθησης  
(*Γλυκοκορτικοειδών ή/και τροποποιητικών της νόσου φαρμάκων (DMARDs) ή/και βιολογικών παραγόντων καθώς και διάρκεια αγωγής*)
- Ιστορικό ενεργού TB ή έκθεσης στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης στο παρελθόν
- Ιστορικό λήψης πλήρους αντιφυματικής αγωγής ή αγωγής για λανθάνουσα λοίμωξη στο παρελθόν
- Ιστορικό προηγούμενου εμβολιασμού (BCG)
- Ασθενείς που κατά το έτος της μελέτης άλλαξαν βιολογικό παράγοντα  
(*Σε άλλον anti-TNFα ή σε άλλο βιολογικό παράγοντα*) είτε λόγω αναποτελεσματικότητας είτε λόγω μη ανοχής στον πρώτο anti-TNFα παράγοντα)

Όλοι οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη υποβάλλονταν σε τακτικό κλινικοεργαστηριακό έλεγχο κάθε 1-3 μήνες σύμφωνα με την καθιερωμένη κλινική πρακτική για την παρακολούθηση ασθενών που βρίσκονται υπό θεραπεία με anti-TNFα παράγοντες. Επίσης, όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε ακτινογραφία θώρακα τόσο κατά τον αρχικό έλεγχο όσο και κατά την επανεξέταση. Οι ακτινογραφίες εκτιμήθηκαν για την ύπαρξη ευρημάτων συμβατών με παλαιά φυματίωση (αποπιτανωμένα ή μη οζίδια, ινώδεις ουλές) σύμφωνα με δημοσιευμένες κατευθυντήριες οδηγίες.(82;165)

## **Μέθοδοι**

### **Δερματική φυματινοαντίδραση (TST)**

Η TST διενεργήθηκε με τη μέθοδο Mantoux, δηλαδή με ενδοδερμική χορήγηση 0,1 mL (2 IU) κεκαθαρμένης φυματίνης (PPD-RT 23; Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) στο μεσαίο τριτημόριο της καμπτικής επιφάνειας του πήχη, χρησιμοποιώντας βραχεία βελόνα λοξής τομής 26 ή 27 G (σύριγγα Mantoux). Η περιοχή του αντιβραχίου που επιλεγόταν δεν είχε τραύματα, ουλές ή αγγεία και η ένεση γινόταν με τη βελόνη τοποθετημένη σχεδόν παράλληλα με το αντιβράχιο και το λοξό ( κομμένο άκρο της βελόνας )

προς τα επάνω, ώστε να δημιουργηθεί μικρό λευκό έπαρμα με όψη φλοιού πορτοκαλιού και διάμετρο 6-10 mm.(167)

Η εκτίμηση του αποτελέσματος της φυματινοαντίδρασης πραγματοποιήθηκε 48-72 ώρες μετά την ένεση, τόσο με την επισκόπηση όσο και με την ψηλάφηση της ενδεχόμενης σκληρίας σε καλά φωτιζόμενο χώρο. Η όποια πιθανή ερυθρότητα δεν αξιολογήθηκε. Για την αντικειμενοποίηση της μέτρησης της διαμέτρου της σκληρίας εφαρμόστηκε η «μέθοδος της γραφίδας». Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, ανευρίσκονται τα όρια της σκληρίας, σημειώνονται με στυλό και ακολουθεί μέτρηση της διαμέτρου της σκληρίας στον εγκάρσιο άξονα του πήχη με εύκαμπτο υποδεκάμετρο. Τα αποτελέσματα της μέτρησης καταγράφονταν σε χιλιοστά (mm).(167)

#### Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Η TST εκτιμήθηκε ανάλογα με την εγκάρσια διάμετρο της διήθησης σε:

- Διάμετρος < 5mm: Αρνητική
- Διάμετρος ≥ 5 mm: Θετική

Η παραπάνω ερμηνεία βασίστηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες του CDC σύμφωνα με τις οποίες διήθηση δέρματος με διάμετρο ≥ 5 mm θεωρείται θετική σε άτομα που έχουν μολυνθεί από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, σε άτομα που έχουν πρόσφατα έρθει σε στενή επαφή με ασθενείς με ενεργό φυματίωση, σε ασθενείς που στην ακτινογραφία θώρακα έχουν αλλοιώσεις συμβατές με παλαιά TB, σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων καθώς και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (υπό αγωγή με 15mg/ημέρα πρεδνιζολόνης ή αναλόγου της για διάστημα ενός τουλάχιστον μήνα). (84)

#### **Δοκιμασίες Απελευθέρωσης Ιντερφερόνης γ (Interferon Gamma Release Assays-IGRAs)**

Δύο IGRAs, εμπορικά διαθέσιμες και εγκεκριμένες για τη διάγνωση της λοίμωξης από το *M.tuberculosis*, ηT-SPOT.TB (OxfordImmunitec)και η QuantiFERON-TB GoldInTubetest (QFT-GIT) (CellestisLimited, Carnegie, Victoria, Australia) χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας.

## **Πρωτόκολλο τεχνικής T-SPOT.TB**

Η δοκιμασία T-SPOT.TB είναι μια παραλλαγή της εξαιρετικά ευαίσθητης τεχνικής ELISPOT, κατά την οποία η κυτταροκίνη-στόχος συλλαμβάνεται απευθείας από το εκκριτικό κύτταρο, πριν αυτή αραιωθεί στο υπερκείμενο ή συλληφθεί από υποδοχείς άλλων κυττάρων ή αποδομηθεί.

Από ένα δείγμα ολικού αίματος διαχωρίστηκαν μονοπύρηνια κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMC) και καταμετρήθηκαν ώστε ένας συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων να χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται ότι ακόμα και σε άτομα με χαμηλούς τίτλους T κυττάρων(π.χ. περιπτώσεις ανοσοκαταστολής) προστίθεται επαρκής αριθμός κυττάρων στις μικροκυψελίδες μικροτιτλοδότησης.

Τέσσερις μικροκυψελίδες απαιτούνται για κάθε δείγμα:

- 1.Ένας αρνητικός μάρτυρας (Nil) για την αναγνώριση μη ειδικής κυτταρικής ενεργοποίησης
- 2.TB-ειδικά αντιγόνα: Ομάδα A (ESAT-6)
- 3.TB-ειδικά αντιγόνα: Ομάδα B (CFP10).
- 4.Ένας θετικός μάρτυρας που περιέχει φυτοαιμοσυγκολλητίνη (PHA, ένας γνωστός πολυκλωνικός ενεργοποιητής) για να επιβεβαιώσει τη λειτουργικότητα των PBMC.

Τα PBMC επωάσθηκαν με τα αντιγόνα ώστε να επιτραπεί διέγερση τυχόν ευαισθητοποιημένων T κυττάρων που είναι παρόντα. Η εκκρινόμενη IFN- $\gamma$  συλλαμβάνεται από ειδικά αντισώματα στη μεμβράνη (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης IFN- $\gamma$ ), που σχηματίζει τη βάση της μικροκυψελίδας. Ένα δεύτερο αντίσωμα (μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης IFN- $\gamma$ ), συζευγμένο σε αλκαλική φωσφατάση το οποίο κατευθύνεται σε ένα διαφορετικό επίτοπο στο μόριο της IFN- $\gamma$ , προστίθεται και συνδέεται στην κυτοκίνη που έχει συλληφθεί στην επιφάνεια της μεμβράνης. Ένα διαλυτό υπόστρωμα προστίθεται σε κάθε μικροκυψελίδα. Αυτό διασπάται μέσω δεσμευμένου ενζύμου ώστε να σχηματίσει μια κηλίδα αδιάλυτου ιζήματος στο σημείο της αντίδρασης. Κάθε κηλίδα αντιπροσωπεύει το ίχνος ενός μεμονωμένου T κυττάρου που εκκρίνει IFN- $\gamma$ , και η αξιολόγηση του αριθμού των κηλίδων που λαμβάνονται παρέχει μια μέτρηση του πλήθους των ευαίσθητων στο *M. Tuberculosis* δραστικών T κυττάρων στο

περιφερειακό αίμα. Αναλυτικότερα, το πρωτόκολλο της τεχνικής T-SPOT.TB ορίζει τα ακόλουθα στάδια:

#### A) Συλλογή δείγματος και προετοιμασία

Σε ενήλικες ασθενείς λαμβάνονται με φλεβοκέντηση 8ml περιφερικού αίματος σε ηπαρινισμένο σωληνάριο. Σε ασθενείς, όπως αυτοί που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη μας, που είναι πιθανό να έχουν μειωμένο αριθμό κυττάρων, απαιτείται η συλλογή 2x8ml περιφερικού αίματος, ώστε να διασφαλιστεί επαρκής αριθμός PBMCs για την ομαλή διεξαγωγή της δοκιμασίας. Η φλεβοκέντηση πάντα προηγούνταν της φυματινοαντίδρασης, ώστε να παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση των δοκιμασιών και να μην είναι δυνατή η οποιαδήποτε παρεμβολή της TST στο αποτέλεσμα της IGRA.

#### B) Απομόνωση PBMCs

Το ολικό αίμα αραιώνεται με ίσο όγκο υλικού RPMI 1640, το οποίο έχει προθερμανθεί στους 37°C, και το σωληνάριο ανακινείται 3 φορές ελαφρά. Τοποθετούμε 3 όγκους αραιωμένου αίματος πάνω από ένα όγκο FICOLL-PAQUE PLUS με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αναμειχθούν τα υλικά και κατόπιν φυγοκεντρούμε στα 1000g για 22 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C). Πλέον, στο σωληνάριο είναι ορατά τέσσερα στρώματα: α) του πλάσματος, β) των μονοπύρηνων κυττάρων, γ) του FICOLL, και δ) των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Συλλέγουμε τη λευκή, θολή ζώνη των PBMC, που μεταφέρεται σε ένα κωνικό σωληνάριο φυγοκέντρησης των 15ml. Αναπληρώνουμε τον όγκο στα 10ml με υλικό κυτταροκαλλιέργειας AIMV (υλικό απαλλαγμένο από ορό) και φυγοκεντρούμε στα 600g για 7 λεπτά.

Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα (pellet/σύμπηκτο) σε 1ml AIM V. Αναπληρώνουμε τον όγκο στα 10ml με το ίδιο υλικό και φυγοκεντρούμε στα 350g για 7 λεπτά. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα (pellet) σε 0,7ml μέσο καλλιέργειας AIMV.

### Γ) Μέτρηση κυττάρων και αραιώση

Ο προσδιορισμός T-SPOT.TB απαιτεί  $2.5 \times 10^5$  βιώσιμα PBMC ανά κυψελίδα. Προσθέτουμε 10μl από το τελικό κυτταρικό εναιώρημα σε 40μl 0.4% (w/v) κυανού του τρυπανίου. Τοποθετούμε 10μl του μείγματος σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και καταμετρούμε τα κύτταρα στο πλέγμα. Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των κυττάρων που είναι παρόντα στο πυκνό κυτταρικό εναιώρημα. Προετοιμάζουμε 500μl από το τελικό κυτταρικό εναιώρημα σε συγκέντρωση  $2.5 \times 10^5$  κύτταρα/100μl.

### Δ) Προετοιμασία πλάκας και επώαση

Για κάθε δείγμα ασθενούς απαιτούνται 4 μικροκυψελίδες. (Εικόνα 16) Πριν τη χρήση οι μικροκυψελίδες πρέπει να τοποθετούνται σε πλάκα μικροτιτλοδότησης και να έχουν εξισορροπήσει σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε μικροκυψελίδα ενοφθαλμίζουμε 100μl από το τελικό κυτταρικό εναιώρημα του ασθενούς, δηλαδή  $2.5 \times 10^5$  βιώσιμα PBMC.

Στη συνέχεια προστίθεται 50μl υλικού καλλιέργειας AIMV στην μικροκυψελίδα του μάρτυρα Nil. Στην επόμενη μικροκυψελίδα προσθέτουμε 50μl διαλύματος Ομάδας A (περιέχει συνθετικά αντιγόνα ESAT-6, λευκωματίνη βόειου ορού και αντιμικροβιακούς παράγοντες). Στην τρίτη μικροκυψελίδα προσθέτουμε 50μl διαλύματος Ομάδας B (περιέχει συνθετικά αντιγόνα CFP-10, λευκωματίνη βόειου ορού και αντιμικροβιακούς παράγοντες) ενώ στην τελευταία μικροκυψελίδα προσθέτουμε 50μl διαλύματος θετικού μάρτυρα κυτταρικής λειτουργικότητας (περιέχει φυτοαιματοσυγκολλητίνη, λευκωματίνη βόειου ορού και αντιμικροβιακούς παράγοντες). Στη συνέχεια η πλάκα επωάζεται σε επωαστήρα υγρού τύπου στους  $37^\circ\text{C}$  με 5%  $\text{CO}_2$  για 16-20 ώρες.

- Nil Control
- Panel A (ESAT-6)
- Panel B (CFP10)
- Positive Control

**Εικόνα 16. Κάτοψη επωαστικής πλάκας**



#### Ε) Εμφάνιση κηλίδων (spot) και μέτρηση αυτών

Η πλάκα μικροτιτλοδότησης απομακρύνεται από τον επωαστήρα και το υλικό της κυτταροκαλλιέργειας απορρίπτεται και σε κάθε μικροκυψελίδα προστίθενται 200μl D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), τα οποία και αυτά με τη σειρά τους θα απορριφθούν. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία με νέο D-PBS για κάθε πλύση ακόμα 3 φορές. Αραιώνουμε το συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζεύγματος (Conjugate Reagent), το οποίο έχουμε φροντίσει να βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου, 200 φορές σε D-PBS και δημιουργούμε έτσι το διάλυμα ισχύος εργασίας. Σε κάθε μικροκυψελίδα προσθέτουμε 50μl από το διάλυμα ισχύος εργασίας του αντιδραστηρίου συζεύγματος (working strength Conjugate Reagent) και επωάζουμε για μία ώρα στους 2-8 °C.

Κατόπιν απορρίπτουμε το σύζευγμα και πραγματοποιούμε τέσσερις πλύσεις με D-PBS, όπως προαναφέρθηκε. Προσθέτουμε 50μl διάλυμα υποστρώματος σε κάθε μικροκυψελίδα και επωάζουμε την πλάκα σε θερμοκρασία δωματίου για 7 λεπτά. Για να σταματήσουμε την αντίδραση ανίχνευσης πλένουμε προσεκτικά με αποσταγμένο νερό. Αφήνουμε την πλάκα να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου ολονύκτια. Όσο στεγνώνουν οι μικροκυψελίδες, τόσο γίνονται περισσότερο ορατές οι κηλίδες. Τέλος, καταμετρούμε και καταγράφουμε τον αριθμό των σκούρων κυανών, ευδιάκριτων κηλίδων που είχαν εμφανιστεί πάνω στη μεμβράνη κάθε μικροκυψελίδας.(168)

#### ΣΤ) Ερμηνεία Αποτελεσμάτων

Ένα αποτέλεσμα για να θεωρείται έγκυρο θα πρέπει να έχει λίγες ή καθόλου κηλίδες στο μάρτυρα Nil και περισσότερες από 20 κηλίδες στο θετικό μάρτυρα κυτταρικής λειτουργικότητας. Μία καταμέτρηση κηλίδων στο μάρτυρα Nil  $\geq 10$  κηλίδων καθιστά το αποτέλεσμα της δοκιμασίας «Ακαθόριστο». Η καταμέτρηση των κηλίδων στον θετικό μάρτυρα θα πρέπει να είναι  $\geq 20$  κηλίδων συνήθως όμως δείχνει κορεσμό, δηλαδή υπερβολικά μεγάλο αριθμό κηλίδων για να καταμετρηθούν. Αν ο αριθμός των κηλίδων του θετικού μάρτυρα είναι  $< 20$ , το αποτέλεσμα θεωρείται ως «Ακαθόριστο/Αδιευκρίνιστο». Εξάρεση σε αυτόν τον κανόνα αποτελεί η περίπτωση όπου είτε η Ομάδα Α είτε η Ομάδα Β είναι «Θετική» (σύμφωνα με

τα κριτήρια που θα περιγραφούν στη συνέχεια), οπότε και το αποτέλεσμα της IGRA είναι έγκυρο. Αποτελέσματα όπου το μεγαλύτερο του (Ομάδα A μείον μάρτυρας Nil) ή/ και (Ομάδα B μείον μάρτυρας Nil) είναι 5, 6, ή 7 κηλίδες θεωρούνται «Οριακά». Τα οριακά αποτελέσματα είναι έγκυρα αλλά σαφώς λιγότερο αξιόπιστα από τα αυτά των οποίων η καταμέτρηση είναι πέρα από την αποκοπή.

Τα αποτελέσματα της δοκιμασίας T-SPOT.TB ερμηνεύονται αφαιρώντας τον αριθμό των κηλίδων στη μικροκυψελίδα του μάρτυρα Nil από τον αριθμό των κηλίδων σε καθεμία από τις μικροκυψελίδες των Ομάδων A και B, σύμφωνα με τον ακόλουθο αλγόριθμο:

- Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι «Θετικό» εάν (Ομάδα A μείον μάρτυρας Nil) ή/και (Ομάδα B μείον μάρτυρας Nil)  $\geq 8$  κηλίδες.
- Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι «Αρνητικό» εάν (Ομάδα A μείον μάρτυρας Nil) και (Ομάδα B μείον μάρτυρας Nil)  $\leq 4$  κηλίδες. Αυτό περιλαμβάνει και τιμές μικρότερες του μηδενός.

Ένα «Θετικό» αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το δείγμα περιέχει δραστικά T κύτταρα αντιδρώντα στο *M. tuberculosis*. Ένα «Αρνητικό» αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι το δείγμα πιθανώς δεν περιέχει δραστικά T κύτταρα αντιδρώντα στο *M. tuberculosis*. Ενώ τα αντιγόνα ESAT-6 και CFP10 είναι απόντα από στελέχη BCG του *M. Bovis* και από τα περισσότερα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια, είναι πιθανό ένα «Θετικό» αποτέλεσμα της δοκιμασίας T-SPOT.TB να οφείλεται σε λοίμωξη με *M. kansasii*, *M. Szulgai*, *M. Marinum* ή *M. gordonae*.(82;169) (Πίνακας 6)

<b>ΕΡΜΗΝΕΙΑ</b>	<b>Nil</b>	<b>(Ομάδα A-Nil) ή/κ (Ομάδα B-Nil)</b>	<b>Μιτογόνο</b>
Θετικό	$\leq 10$ κηλίδες	$\geq 8$ κηλίδες	οσεσδήποτε
Οριακό	$\leq 10$ κηλίδες	5,6 ή 7 κηλίδες	οσεσδήποτε
Αρνητικό	$\leq 10$ κηλίδες	$\leq 4$ κηλίδες	οσεσδήποτε
Αδιευκρίνιστο	$>10$ κηλίδες $\leq 10$ κηλίδες	οσεσδήποτε <5 κηλίδες	οσεσδήποτε <20 κηλίδες

**Πίνακας 6. Ερμηνεία αποτελεσμάτων της δοκιμασίας T-SPOT.TB.**

## **Πρωτόκολλο τεχνικής QuantiFERON-TB Gold In-Tube test**

### **A) Συλλογή δείγματος – Επώαση-Λήψη και Διαχείριση πλάσματος**

Για κάθε ασθενή απαιτούνται τρία ειδικά σωληνάρια QFT-GIT. Το ένα αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα και περιέχει μόνο ηπαρίνη (Nil control) και το άλλο περιέχει το θετικό μάρτυρα κυτταρικής λειτουργικότητας και περιέχει φυτοαιματοσυγκολλητίνη (PHA), ηπαρίνη και δεξτρόζη. Στο εσωτερικό των τοιχωμάτων του τρίτου σωληναρίου συλλογής αίματος υπάρχουν αποξηραμένα τα αντιγόνα ESAT-6, CFP-10 και TB7.7 (μείγμα 14 πεπτιδίων που αντιπροσωπεύει ολόκληρες τις αλληλουχίες αμινοξέων των ESAT-6, CFP-10 και τμήμα της αλληλουχίας του TB7.7). Με φλεβοκέντηση συλλέγεται 1ml περιφερικού αίματος για κάθε ένα από τα σωληνάρια και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση των σωληναρίων ώστε το περιεχόμενό τους να αναμιχθεί σχολαστικά με το αίμα. Τα σωληνάρια, το συντομότερο δυνατόν και εντός 16 ωρών από τη συλλογή του αίματος, τοποθετούνται σε κατακόρυφη θέση σε επωαστήρα (που δε χρήζει CO<sub>2</sub> ή εφύγρανσης) για 16-24 ώρες στους 37°C. Πριν από την επώαση, τα σωληνάρια φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (22 ± 5°C). Αν το αίμα δεν επωαστεί αμέσως μετά τη συλλογή, θα πρέπει να γίνει ξανά ανάδευση των σωληναρίων ακριβώς πριν την επώαση. Η φλεβοκέντηση πάντα προηγούνταν της φυματοαντίδρασης, ώστε να παρεμποδίζεται η αλληλεπίδραση των δοκιμασιών και να μην είναι δυνατή η οποιαδήποτε παρεμβολή της TST στο αποτέλεσμα της IGRA.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των σωληναρίων επί 15 λεπτά με ταχύτητα 2.000-3.000g. Το βύσμα γέλης θα διαχωρίσει τα κύτταρα από το πλάσμα. Τα δείγματα πλάσματος συλλέγονται προσεκτικά με πιπέτα με τρόπο τέτοιο ώστε να μην διαταραχθούν τα κύτταρα και μπορούν να τοποθετηθούν απευθείας στην πλάκα της QFT-GIT ELISA. Αν αυτό δεν είναι δυνατό, φυλάσσονται μέχρι 28 ημέρες σε θερμοκρασία 2-8°C ή σε θερμοκρασία μικρότερη των -20°C για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Μετά την επώαση στους 37°C, τα σωληνάρια συλλογής αίματος μπορούν να φυλαχθούν έως και 3 ημέρες πριν από τη φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία μεταξύ 4°C και 27°C.

## B) Μέθοδος ELISA-Υπολογισμοί και Ερμηνεία Αναλύσεων

Μετά την επώαση και την συλλογή του πλάσματος ακολουθεί η μέτρηση της IFN- $\gamma$  με τη μέθοδο της ELISA. Το μετρούμενο μέγεθος της οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιείται στον υπολογισμό του αποτελέσματος. Πιο συγκεκριμένα, ο τελικός υπολογισμός πραγματοποιείται με τολογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης QFT-GIT (διαθέσιμο στον ιστότοπο [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com)), το οποίο χρησιμοποιείται στην ανάλυση πρωτογενών δεδομένων και στον υπολογισμό των αποτελεσμάτων. Το λογισμικό έχει τη δυνατότητα να εκτελεί εκτίμηση ελέγχου ποιότητας στην ανάλυση, να σχεδιάζει την πρότυπη καμπύλη και να δίνει ένα αποτέλεσμα εξέτασης για κάθε εξεταζόμενο δείγμα.

Η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της εξέτασης εξαρτάται από την πρότυπη καμπύλη, η ορθότητα της οποίας εξετάζεται πριν ερμηνευτούν τα αποτελέσματα των εξεταζόμενων δειγμάτων. Το χρησιμοποιούμενο λογισμικό πρόγραμμα ανάλυσης έχει τη δυνατότητα να υπολογίζει και να αναφέρει τις απαιτούμενες παραμέτρους ελέγχου ποιότητας της καμπύλης. Αν τα κριτήρια δεν πληρούνται, η ανάλυση θεωρείται άκυρη και επαναλαμβάνεται.

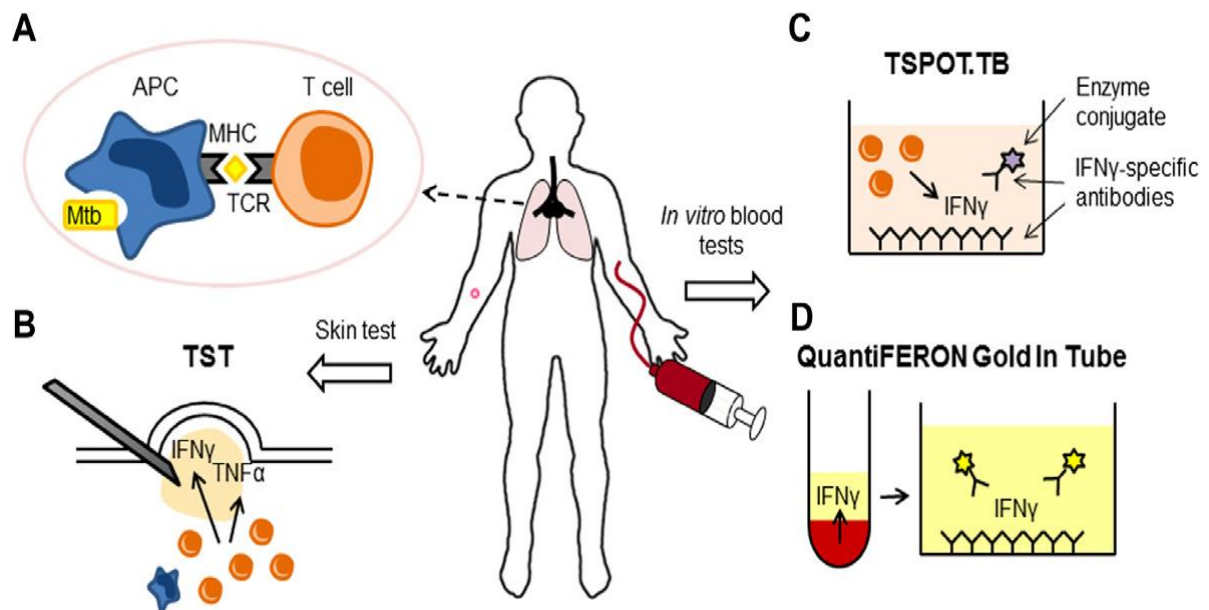
Τα αποτελέσματα της μελέτης μας ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα κριτήρια του Centers for Disease Control and Prevention (CDC) κατά τα οποία η απόκριση στην TB υπολογίζεται ως η διαφορά της συγκέντρωσης της IFN- $\gamma$  στο πλάσμα αίματος που έχει διεγερθεί από τα αντιγόνα μείον τη συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  στο πλάσμα αίματος που έχει επωαστεί χωρίς αντιγόνα (δηλαδή του αρνητικού μάρτυρα Nil). (182) Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι «Θετικό» όταν η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  στον αρνητικό μάρτυρα είναι  $\leq 8,0$  IU/ml, η απόκριση στην TB είναι  $\geq 0,35$  IU/ml και 25%  $\geq$  του αρνητικού μάρτυρα ανεξάρτητα από την απόκριση στο μιτογόνο. Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας είναι «Αρνητικό» όταν η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  στον αρνητικό μάρτυρα είναι  $\leq 8,0$  IU/ml, η απόκριση στην TB είναι  $< 0,35$  IU/ml ή 25%  $<$  του αρνητικού μάρτυρα, και η απόκριση στο μιτογόνο είναι  $\geq 0,5$  IU/ml. Το αποτέλεσμα θεωρείται «Ακαθόριστο/Αδιευκρίνιστο» είτε όταν η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  στον αρνητικό μάρτυρα είναι  $\leq 8,0$  IU/ml, η απόκριση στην TB είναι  $< 0,35$  IU/ml ή 25%  $<$  του αρνητικού μάρτυρα, και η απόκριση στο μιτογόνο είναι  $< 0,5$  IU/ml

είτε στην περίπτωση που η συγκέντρωση της IFN-γ στον αρνητικό μάρτυρα είναι > 8,0 IU/ml ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις στο μιτογόνο και στην απόκριση στην TB. (Πίνακας 7)

ΕΡΜΗΝΕΙΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΑΡΤΥΡΑΣ NIL	ΑΠΟΚΡΙΣΗ TB	ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΜΙΤΟΓΟΝΟ
ΘΕΤΙΚΗ	≤ 8,0 IU/ml	≥ 0,35 IU/ml και 25% ≥ NIL	ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ
ΑΡΝΗΤΙΚΗ	≤ 8,0 IU/ml	< 0,35 IU/ml ή 25% < NIL	≥0,5 IU/ml
ΑΔΙΕΥΚΡΙΝΙΣΤΗ	≤ 8,0 IU/ml >8,0 IU/ml	< 0,35 IU/ml ή 25% <NIL ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ	<0,5 IU/ml ΟΠΟΙΑΔΗΠΟΤΕ

**Πίνακας 7. Ερμηνεία αποτελεσμάτων δοκιμασίας QFT-GIT.**

Ένα «Θετικό» αποτέλεσμα στη δοκιμασία QFT-GIT σημαίνει ότι είναι πιθανή η λοίμωξη από το *M.tuberculosis* ενώ το «Αρνητικό» αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι η λοίμωξη δεν είναι πιθανή. Δεν πρέπει επίσης να παραβλέπεται το γεγονός ότι τα αντιγόνα ESAT-6 και CFP-10 ανευρίσκονται εκτός από το *M. Tuberculosis* και στα περιβαλλοντικά μυκοβακτηρίδια *M. Kansasii*, *M. Szulgai*, και *M. Marinum*. Η ευαισθητοποίηση σε κάποιον από αυτούς τους μικροοργανισμούς μπορεί να οδηγήσει επίσης σε παραγωγή IFN-γ μετά την επώαση με τα παραπάνω αντιγόνα, με συνέπεια ένα «ψευδώς θετικό» αποτέλεσμα. Στην περίπτωση που το αποτέλεσμα είναι «Ακαθόριστο/Αδιευκρίνιστο» η πιθανότητα της λοίμωξης είναι αβέβαιη και η εξέταση πρέπει να επαναληφθεί. Οι αρχές των IGRAs, η TST και το ανοσολογικό υπόβαθρο των μεθόδων απεικονίζονται στην εικόνα 17.



**Εικόνα17. Η ανοσολογική βάση των TST και IGRAs.**

(A) Κατά την TB λοίμωξη, η φαγοκυττάρωση των μυκοβακτηριδίων στους πνεύμονες και η παρουσίαση των αντιγόνων από τα APCs στους λεμφοκύτταρους επάγουν την διέγερση αντιγονοειδικών T-κυττάρων. (B) Η TST ανιχνεύει *in vivo* την αντίδραση υπερευαισθησίας που ακολουθεί την ενδοδερμική ένεση των μυκοβακτηριδιακών αντιγόνων. (Γ,Δ) Οι IGRAs ανιχνεύουν *in vitro* την απελευθέρωση IFN- $\gamma$  από τα T-κύτταρα έπειτα από ολονύκτια επώαση ολικού αίματος ή PBMCs με μυκοβακτηριδιακά αντιγόνα.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράστηκαν ως μέση  $\pm$  SD ή διάμεση τιμή και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (Inter quartile Range-IQR), ενώ οι ονομαστικές μεταβλητές παρουσιάστηκαν σε απόλυτες και (%) τιμές. Ο αμφίπλευρος έλεγχος (Fisher's exact test) χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των κατηγορικών μεταβλητών, ενώ για τις συνεχείς μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Wilcoxon rank test. Η ανάλυση παλινδρόμησης πραγματοποιήθηκε μέσω δυαδικού λογισμικού προκειμένου να εντοπιστούν παράγοντες που σχετίζονται με την μετατροπή της δοκιμασίας διαλογής της φυματίωσης. Οι τεχνικές επαναδειγματοληψίας εφαρμόστηκαν για την αντιμετώπιση του μικρού μεγέθους της μελέτης και την επικύρωση των κύριων αποτελεσμάτων.

Η στατιστική ανάλυση διεξήχθη με τη βοήθεια των στατιστικών πακέτων SPSS Statistics V.17.0 (SPSS, Chicago, Illinois, USA) και STATA V.11.1 (StataCorp, College Station, Texas, USA). Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε στο  $p < 0.05$ .

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Ασθενείς μελέτης

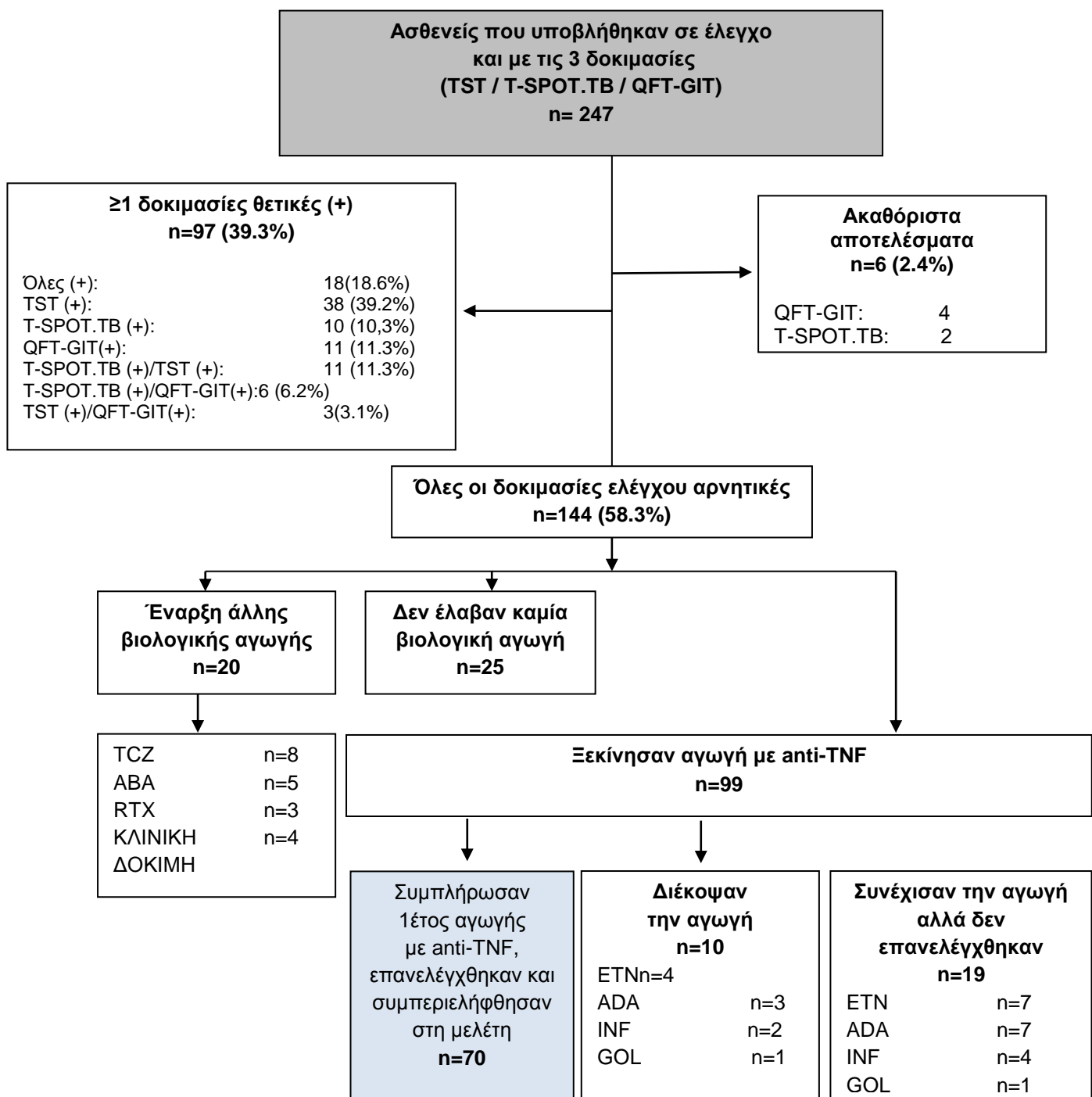
Σε κανέναν από τους ασθενείς δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες λόγω της φυματινοαντίδρασης. Στις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες συμπεριελήφθησαν: αναφυλακτικές αντιδράσεις, αντίδραση ξένου σώματος στη θέση της έγχυσης, οίδημα και ερυθρότητα του άνω άκρου, αλλεργικές αντιδράσεις, τοπική λεμφαγγειίτιδα και λεμφαδενίτιδα. (170;171)

Από τους 247 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε έλεγχο για LTBI και με τις τρεις διαθέσιμες δοκιμασίες, κατά το χρονικό διάστημα της ενσωμάτωσης των ασθενών στη μελέτη (εικόνα 14), 6 ασθενείς (2,4%) δεν συμπεριελήφθησαν στην μελέτη λόγω ακαθόριστων αποτελεσμάτων στις δοκιμασίες απελευθέρωσης ιντερφερόνης (QF-GIT: n=4 , T-SPOT.TB: n=2). Επίσης, αποκλείστηκαν από τη μελέτη 97 ασθενείς (39,3%) οι οποίοι είχαν τουλάχιστον μία δοκιμασία θετική.

Αναλυτικότερα, εκ των αποκλεισμένων 97 ασθενών, 18 άτομα (18,6%) είχαν θετικές όλες τις δοκιμασίες, θετική TST είχαν 38 (39,2%), 10 ασθενείς (10,3%) είχαν θετική T-SPOT.TB, ενώ θετική QFT-GIT είχαν 11 ασθενείς (11,3%). Επίσης, 11 ασθενείς (11,3%) είχαν ταυτόχρονα θετικές την TST και την T-SPOT.TB, ενώ 3 ασθενείς (3,1%) είχαν ταυτόχρονα θετικές την TST και την QFT-GIT. Τέλος, 6 ασθενείς (6,2%) είχαν θετικές και τις δύο διαθέσιμες IGRAs.

Από τους 144 (58,3%) ασθενείς που ήταν αρνητικοί κατά τον αρχικό έλεγχο, 20 έλαβαν βιολογικό παράγοντα που δεν ανήκε στην κατηγορία των anti-TNF και 25 δεν ξεκίνησαν τελικά καμία επιπρόσθετη αγωγή, με συνέπεια να εξαιρεθούν της μελέτης. Ασθενείς που διέκοψαν την αγωγή με anti-TNF παράγοντες πριν συμπληρωθεί ένα έτος παρακολούθησης (n=10) επίσης αποκλείστηκαν από τη τελική μελέτη. (Εικόνα18)

Μετά τον αποκλεισμό των παραπάνω ασθενών, 70 ασθενείς με αρνητικές όλες τις δοκιμασίες ελέγχου που έλαβαν anti-TNFs για 1 έτος συμπεριλήφθησαν στη μελέτη.



**Εικόνα 18**

**Διάγραμμα ροής όπου απεικονίζονται ο έλεγχος για LTBI και η κατανομή των 247 ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης (Οκτώβριος 2009-Δεκέμβριος 2013).**

Στο σημασμένο κελί φαίνονται οι 70 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη.



## ΧΑΡΑΚΗΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΝΑΡΞΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Από τους 70 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, οι 44 ήταν γυναίκες (63%) και οι 26 ήταν άνδρες (37%). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν  $50.5 \pm 15.5$  έτη, ενώ 39 (56%) ήταν > 50 ετών. Από ρευματοειδή αρθρίτιδα νοσούσαν 33 ασθενείς (47%) και όμοιος αριθμός 33 ασθενών (47%) από σπονδυλαρθροπάθειες [αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα:  $n=16$  (23%), ψωριασική αρθρίτιδα:  $n=17$  (24%)], ενώ 4 από τους συμμετέχοντες έπασχαν από άλλα ρευματικά νοσήματα. Η μέση διάρκεια νόσου ήταν  $8.2 \pm 8.8$  έτη.

Εμβολιασμό με BCG κατά την εφηβεία ή την πρώιμη ενηλικίωση, ανέφεραν 19 ασθενείς (27%). 63% των ασθενών ( $n=44$ ) είχε τουλάχιστον έναν παράγοντα κινδύνου για TB. Στους παράγοντες κινδύνου συμπεριελήφθησαν η πιθανή έκθεση στο *M. Tuberculosis*, η ηλικία > 50 ετών καθώς και η γέννηση ή η προηγούμενη διαμονή σε χώρα με υψηλό επιπολασμό της φυματίωσης.

Κατά τη διάρκεια του πρώτου ελέγχου για TB, υπό αγωγή με συνθετικά τροποποιητικά της νόσου φάρμακα (csDMARDs), βρίσκονταν 44 ασθενείς (63%). Αναλυτικότερα, 75% αυτών ελάμβαναν μεθοτρεξάτη, 18% λεφλουνομίδη, 5% κυκλοσπορίνη και 2% υδροξυχλωροκίνη. Κορτικοστεροειδή χορηγούνταν σε 30 ασθενείς (43%) σε μέση ημερήσια δόση των  $6,6 \pm 3,6$  mg. Κατά τη διάρκεια της αγωγής με τους anti-TNFα παράγοντες δεν σημειώθηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στην προαναφερθείσα θεραπεία.

Από τους 70 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στην μελέτη, οι 27 τέθηκαν αρχικά υπό αγωγή με adalimumab (39%), 16 με infliximab (23%), 14 με etanercept (20%), 8 με golimumab (11%) και 5 και certolizumab pegol (7%). Κατά τη διάρκεια του έτους παρακολούθησης σε 6 ασθενείς (9%) τροποποιήθηκε η αγωγή σε άλλον anti-TNF παράγοντα είτε λόγω μη ανταπόκρισης είτε λόγω μη ανοχής στον πρώτο anti-TNF παράγοντα. Ειδικότερα, 3 ασθενείς έλαβαν ανταλιμουμάμπη αντί για ινφλιξιμάμπη, 2 ετανερσέπτη αντί για ανταλιμουμάμπη και 1 ανταλιμουμάμπη αντί για ετανερσέπτη. Κατά τη στατιστική ανάλυση δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των χαρακτηριστικών των ασθενών που έλαβαν διαφορετικούς βιολογικούς παράγοντες.

## **Δοκιμασίες επανελέγχου για LTBI κατά τη διάρκεια αγωγής με anti-TNFα παράγοντες**

Στον επανέλεγχο που πραγματοποιήθηκε, ενώ οι ασθενείς ελάμβαναν ήδη επί ένα έτος αγωγή με anti-TNFπαράγοντες, 20 από τους 70 ασθενείς (29%) θετικοποίησαν τουλάχιστον μία από τις τρεις δοκιμασίες ελέγχου, ενώ 71%(50/70) παρέμειναν αρνητικοί και στις τρεις δοκιμασίες.

Από τους 20 ασθενείς με θετικοποίησης ή περισσότερων δοκιμασιών, οι 12 ήταν γυναίκες (60%) και οι 8 άνδρες. Η μέση ηλικία τους ήταν  $50.5 \pm 18.2$  έτη, ενώ 11 εξ αυτών (55%) ήταν > 50 ετών.

Εννέα ασθενείς νοσούσαν από ρευματοειδή αρθρίτιδα (45%) και 9 (45%) από σπονδυλαρθροπάθειες ([αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα: n= 3 (15%), ψωριασική αρθρίτιδα: n= 6 (30%)], ενώ 2 από τους ασθενείς έπασχαν από άλλα ρευματικά νοσήματα. Η μέση διάρκεια νόσου ήταν  $8,75 \pm 7,25$  έτη.

Κατά την εφηβεία ή την πρώιμη ενηλικίωση 5 από τους 20 ασθενείς (25%) είχαν εμβολιαστεί με BCG. Το 20% των ασθενών (n=4) είχαν τουλάχιστον έναν παράγοντα κινδύνου για TB (ελέγχθηκαν οι ίδιοι παράγοντες όπως και παραπάνω).

Υπό αγωγή με τροποποιητικά της νόσου φάρμακα (DMARDs) βρίσκονταν 13 ασθενείς (65%) (μεθοτρεξάτη: n=10(50%), λεφλουνομίδη: n=2(10%), κυκλοσπορίνη: n=1(5%)), ενώ υπό αγωγή με κορτικοστεροειδή ήταν 9 ασθενείς (45%) σε μέση ημερήσια δόση των  $5,6 \pm 1,7$  mg.

Όσον αφορά τους anti- TNFα παράγοντες, 8 ασθενείς (40%) ελάμβαναν adalimumab, 1 infliximab (5%), 7 etanercept (35%), 2 golimumab (10%) και 2 certolizumab pegol (10%). (Πίνακας 8)

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ				
Χαρακτηριστικό	Σύνολο (n=70)	Θετικοποίηση ≥ 1 δοκιμασίας (n=20)	Αρνητικός Επ ανέλεγχος (n=50)	p
Φύλο (Α/Γ)	26/44	8/12	18/32	0,789
Ηλικία (έτη), μέσος ± 1 SD	50.5±15.5	50.5±18,2	50,5±14,4	0,907
Ηλικία >50 έτη, n (%)	39(56)	11(55)	28(56)	0,619
<b>Ρευματικό νόσημα, n (%)</b>				
ΡΑ	33(47)	9(45)	24(48)	1
Σπονδυλοαρθρίτιδες	33(47)	9(45)	24(48)	1
ΑΣ	16(23)	3(15)	13(26)	0,529
ΨΑ	17(24)	6(30)	11(22)	0,542
Άλλο	4(6)	2(10)	2(4)	0,572
Διάρκεια νόσου(έτη), Μέση ± 1 SD (διάμεση)	8,2±8,8(5)	8,75±7,25	7,97±9,5	0,375
Προηγούμενος BCG εμβολιασμός, n(%)	19(27)	5(25)	14(28)	1
Πιθανή προηγούμενη έκθεση σε TB, n(%)*	8(11)	4(20)	4(8)	0,213
Παράγοντες κινδύνου για TB≥1, n(%)	44(63)	13(65)	31(62)	1
Συγχωρηγούμενη αγωγή, n (%)				
DMARDs	44(63)	13(65)	31(62)	1
MTX	33(47)	10(50)	23(46)	0,796
LEF	8(11)	2(10)	6(12)	1
CsA	2(3)	1(5)	1(2)	0,492
HCQ	1(1)	0(0)	1(2)	1
Κορτικοστεροειδή	30(43)	9(45)	21(42)	1
Δόση κορτικοστεροειδών‡	6,6±3,6(5)	5,6±1,7	7±4,1	0,449
Κορτικοστεροειδή ή DMARDs	49 (70)	13(65)	36(72)	0.576
<b>Anti-TNF αγωγή, n (%)§</b>				
Adalimumab	27(39)	8(40)	19(38)	1
Etanercept	14(20)	7(35)	7(14)	0,094
<b>Infliximab</b>	<b>16(23)</b>	<b>1(5)</b>	<b>15(3)</b>	<b>0,028</b>
Golimumab	8(11)	2(10)	6(12)	1
Certolizumabpegol	5(7)	2(10)	3(6)	0,619

**Πίνακας 8. Περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών (n=70) και εκείνων που θετικοποίησαν μία τουλάχιστον δοκιμασία ελέγχου (n=20) έναντι εκείνων που δεν θετικοποίησαν (n=50).**

\* Πιθανή προηγούμενη έκθεση σε TB : πιθανή μακρινή έκθεση σε TB ή γέννηση/διαμονή σε χώρα με υψηλό επιπολασμό σε TB, † Παράγοντες κινδύνου για TB : ηλικία >50 έτη, πιθανή προηγούμενη έκθεση σε TB

‡Σε mg/day, mean ± 1 SD (median).

§Εξι ασθενείς άλλαξαν anti-TNF παράγοντα κατά τη διάρκεια του έτους παρακολούθησης : τρεις από ινφλιξιμάμπη σε ανταλιμουμάμπη, δύο από ανταλιμουμάμπη σε ετανερσέπτη, και ένας από ετανερσέπτη σε ανταλιμουμάμπη. CsA, κυκλοσπορίνη; DMARDs, τροποποιητικά της νόσου φάρμακα; F, γυναίκες; HCQ, υδρόξυχλωροκίνη ; LEF, λεφλουνομίδη; M, άνδρες; MTX, μεθοτρεξάτη; TB, φυματίωση; TNF, παράγοντα σνέκρωση στουόγκου. Στατιστικά σημαντικές τιμές (p<0.05) φαίνονται σε bold γραφή.

No.	Sex/age	Diagnosis	TB risk factors (other than age)	BCG	Steroids	DMARDS	Anti-TNF	TST	T-SPOT.TB	QFT-GIT	INH
1	M/41	Ψ.A	OXI	OXI	OXI	OXI	ETN	10mm			OXI
2	M/55	Ψ.A	OXI	OXI	OXI	OXI	ETN	10mm			OXI
3	M/42	Ψ.A	OXI	OXI	OXI	OXI	ADA			28,02IU/ML	OXI
4	F/14	Γ.Π	OXI	NAI	NAI (5mg/d)	OXI	ADA		>100spots (panel a)		OXI
5	F/44	A.Σ	OXI	OXI	OXI	OXI	INFL	11mm			NAI
6	F/63	P.A	OXI	NAI	OXI	LEF	ETN		>100spots (panel A και panel a)		OXI
7	M/25	Ψ.A	OXI	OXI	OXI	MTX	ADA			30,19IU/ML	NAI
8	M/26	Ψ.A	OXI	OXI	OXI	MTX	ETN			0,6IU/ML	NAI
9	F/51	A.Σ	OXI	OXI	OXI	OXI	ADA		8spots (panel a)		NAI
10	F/60	P.A	OXI	NAI	NAI (5mg/d)	MTX	ADA	13mm			NAI
11	F/67	P.A	OXI	OXI	NAI (5mg/d)	MTX	CTZ		>100spots (panel a)		OXI

No.	Sex/age	Diagnosis	TB risk factors (other than age)	BCG	Steroids	DMARDs	Anti-TNF	TST	T-SPOT.TB	QFT-GIT	INH
12	F/54	PA	NAI	OXI	NAI(5mg/d)	LEF	ADA	15mm			OXI
13	M/37	AΣ	OXI	OXI	OXI	OXI	ADA	8mm			NAI
14	M/68	PA	OXI	OXI	NAI(5mg/d)	MTX	ETN	11mm			OXI
15	f/73	PA	NAI	NAI	NAI(5mg/d)	MTX	ADA		15 spots (panel B)		OXI
16	F/72	PA	OXI	OXI	OXI	CsA	ETN			0,48 IU/ml	NAI
17	F/74	PA	OXI	OXI	NAI(5mg/d)	MTX	CTZ		8spots (panel A)		OXI
18	F/73	PA	OXI	OXI	NAI(5mg/d)	MTX	GOL	10mm			OXI
19	F/39	ΨA	NAI	OXI	OXI	MTX	GOL		12spots (panel A)		NAI
20	M/32	N.Still ενηλίκων	NAI	NAI	NAI(10mg/d)	MTX	ETN	15mm		0,44IU/ml	OXI

**Πίνακας 9.** Παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των ασθενών που εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα σε μία τουλάχιστον δοκιμασία (IGRA ή TST) κατά τη διάρκεια του 1 έτους αγωγής με anti-TNF. Επίσης, παρατίθενται τα ατομικά αποτελέσματα των TST, T-SPOT.TB και QFT-GIT.  
 ADA, ανταλιμουμάμπη · AΣ, αγκυλοποιητική σπονδυλίτιδα · CsA, κυκλοσπορίνη · CTZ, σερολιζουμάμπη · DMARDs, τροποποιητικά της νόσου φάρμακα · ETN, ετανερσέπτη · F, θήλυ · GOL, γκολιμουμάμπη · HCQ, υδροξυχλωροκίνη · IGRA, δοκιμασίες απευθείας ιντερφερόνης · INFL, ινφλιξιμάμπη · INH, ισονιαζίδη · LEF, λεφλουονιμίδη · M, άρρεν · MTX, μεθοτρεξάτη · Γ.Π, γαγγρανιώδες πύοδεσμα · ΨA, ψωριασική αρθρίτιδα · QFT-GIT, QuantiferON-TB Gold In Tube · PA, ρευματοειδής αρθρίτιδα · TB, φυματίωση · TNF, παράγοντας νέκρωσης του όγκου · TST, δερματική φυματινοαντίδραση

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στη διεθνή βιβλιογραφία προτείνονται αυστηρότερα κριτήρια ερμηνείας των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών σε περίπτωση επανελέγχου.(172;173;173;174).

Πιο συγκεκριμένα για να αξιολογηθούν ως θετικές οι δοκιμασίες προτείνονται :

- Αύξηση της διαμέτρου της σκληρίας της TST > 6mm από την τιμή που καταγράφηκε κατά τον αρχικό έλεγχο και νέα διάμετρος μεγαλύτερη των 10mm κατά την επανάληψη της δοκιμασίας.(172)
- Αύξηση του αριθμού των κηλίδων / μικροκυψελίδα της T-SPOT.TB από <6 κατά τον αρχικό έλεγχο σε > 9 κηλίδων / μικροκυψελίδα κατά την επανάληψη της δοκιμασίας.(173)
- Συγκέντρωση IFN-γ κατά την νέα QFT-GIT (μετά την επώαση με τα ειδικά αντιγόνα) μεγαλύτερη > 0,7 IU/ml ή > 1 IU/ml.(174)

Αν εφαρμόσουμε αυτά τα κριτήρια στην ερμηνεία των αποτελέσματα των δοκιμασιών του δικού μας πληθυσμού, τότε προκύπτει ότι 15 ασθενείς(21%) έχουν θετικά αποτελέσματα σε μία τουλάχιστον μέθοδο κατά τον επανέλεγχο που πραγματοποιήθηκε, ενώ οι ασθενείς ελάμβαναν ήδη επί ένα έτος αγωγή με anti-TNFα παράγοντες.

Το κριτήριο μετατροπής της TST, με αύξηση της διαμέτρου της > 6 mm σε σχέση με την αρχική τιμή και ταυτόχρονα > 10 mm, πληρούσαν οκτώ ασθενείς (11%). (185) Το αντίστοιχο κριτήριο μετατροπής της T-SPOT.TB ( από <6 κηλίδες / μικροκυψελίδα στον αρχικό έλεγχο σε  $\geq$  9 κηλίδες / μικροκυψελίδα) πληρούσαν πέντε ασθενείς (7%). (186) Τέλος, το κριτήριο μετατροπής της QFT-GIT, σύμφωνα με το οποίο η συγκέντρωση της IFN-γ μετά την επώαση με ειδικά για την TB αντιγόνα πρέπει να είναι > 0.7 IU/mL (ή και 1 IU/mL), πληρούσαν δύο ασθενείς (3%). (186; 187)

Περισσότερες από μία θετικές δοκιμασίες ελέγχου για LTBI παρατηρήθηκαν μόνο σε 1 ασθενή (5%). Ο ασθενής ήταν άνδρας ηλικίας 32

ετών με νόσο Still των ενηλίκων που ελάμβανε αγωγή με πρεδνιζολόνη (10 mg/ημέρα), μεθοτρεξάτη και etanercept( # 20 στον πίνακα 2) και θετικοποίησε την TST και QFT-GIT. Κατά τη διάρκεια του έτους παρακολούθησης δεν ανέφερε επαφή με κρούσμα ενεργού φυματίωσης, όμως ο ασθενής έχει γεννηθεί σε χώρα με υψηλό επιπολασμό της TB. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως, αν και η διάμετρος της σκληρίας της TST μεταβλήθηκε από 0 σε 15mm, η συγκέντρωση της IFN- $\gamma$  μετά την διέγερση από τα ειδικά για την TB αντιγόνα ήταν 0,44 IU/mL, δηλαδή μετρήθηκε σε επίπεδα πολύ κοντά στην τιμή αποκοπής (0,35 IU/mL ) της δοκιμασίας QFT-GIT.

Ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η περίπτωση μίας 39χρονης ασθενούς, που κατά το έτος παρακολούθησης ελάμβανε αγωγή με golimumab για ψωριασική αρθρίτιδα και η οποία ως επαγγελματίας υγείας είχε επιβεβαιωμένη επαφή με ασθενή με ενεργό φυματίωση.(No19/Πίνακας9) Η ασθενής υποβλήθηκε σε έλεγχο και με τις τρεις δοκιμασίες με θετικοποίηση της δοκιμασίας T-SPOT.TB.

### **Παράγοντες που σχετίστηκαν με θετικοποίηση των δοκιμασιών**

Στη στατιστική ανάλυση συμπεριελήφθησαν διάφορα χαρακτηριστικά της ομάδας των ασθενών στους οποίους δεν παρατηρήθηκε θετικοποίηση στις δοκιμασίες ελέγχου για TB κατά τον επανέλεγχο («αρνητικοί»,n=50) και της ομάδας εκείνων των ασθενών οι οποίοι είχαν τουλάχιστον μία θετική δοκιμασία («θετικοί»,n=20). Η σύγκριση των χαρακτηριστικών των ασθενών και των δύο ομάδων που αποτυπώνεται στον πίνακα 20, δεν κατέδειξε μια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων όσον αφορά το φύλο, την ηλικία, τη διάγνωση, τον εμβολιασμό με BCG, την παρουσία παραγόντων κινδύνου για TB ή τη συγχορηγούμενη αγωγή με DMARDs ή κορτικοστεροειδή. Από τους ασθενείς που είχαν  $\geq 1$  θετική δοκιμασία ελέγχου για TB, λιγότεροι ελάμβαναν αγωγή με infliximab (5%) και περισσότεροι etanercept (35%) σε σύγκριση με τους «αρνητικούς», όπου τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 30% και 14% αντίστοιχα . Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική για το infliximab ( $p=0.028$ ), αλλά όχι για το etanercept ( $p=0.094$ ).

Κατά τη διενέργεια της μονοπαραγοντικής ανάλυσης όπου εξετάστηκαν διάφοροι παράγοντες που θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την

θετικοποίηση των δοκιμασιών ελέγχου, όπως η ηλικία >50 ετών, το φύλο, η ρευματοειδής αρθρίτιδα ως νόσημα, η πιθανή προηγούμενη έκθεση σε ενεργό φυματίωση (πιθανή παλαιά έκθεση ή γέννηση/διαμονή σε χώρα με υψηλό επιπολασμό TB), προηγούμενος εμβολιασμός με BCG, καθώς και η φαρμακευτική αγωγή (κορτικοστεροειδή ή DMARDs, anti-TNF) (Πίνακας 10), τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια. Η αγωγή με infliximab ( $p=0.05$ ) και etanercept ( $p=0.054$ ) συσχετίστηκαν οριακά με μεταβολή των αποτελεσμάτων των δοκιμασιών ελέγχου για TB.

Στην πολυπαραγοντική ανάλυση που διενεργήθηκε, στο μοντέλο 1 συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση όλοι οι anti-TNF παράγοντες με τους adalimumab, golimumab ή certolizumab να χρησιμοποιούνται ως πρότυπο αναφοράς. Αναφορικά με το μοντέλο 2 συμπεριελήφθηκε μόνο το infliximab στην ανάλυση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η αγωγή με infliximab ήταν προστατευτική έναντι της εμφάνισης θετικού αποτελέσματος στις δοκιμασίες ελέγχου για TB (model 1: OR 0.048, 95% CI 0.003 to 0.606,  $p=0.017$ ; model 2: OR 0.031, 95% CI 0.002 to 0.414,  $p=0.009$ ). (Πίνακας 10).

Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω με αναδιάταξη, όπου οι «θετικοί» ασθενείς στη μελέτη μας είχαν περίπου 92% λιγότερες πιθανότητες (decreased odds) (model 1: OR 0.087, 95% CI 0.002 to 0.925,  $p=0.0396$ ; model 2: OR 0.05, 95% CI 0.001 to 0.537,  $p=0.005$ ) να λαμβάνουν αγωγή με infliximab έναντι των άλλων anti-TNFα παραγόντων, μετά από προσαρμογή διάφορων συγχυτικών παραγόντων. Η πιθανή προηγούμενη έκθεση σε ενεργό TB επίσης συσχετίστηκε με την εμφάνιση θετικού αποτελέσματος στις δοκιμασίες ελέγχου για TB σε ένα από τα μοντέλα ανάλυσης που εφαρμόστηκαν (model 2: OR 7.243, 95% CI 1.093 to 47.993,  $p=0.04$ ).

Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στα αποτελέσματα όταν η ανάλυση πραγματοποιήθηκε είτε ανάλογα με τον anti-TNFα παράγοντα που οι ασθενείς είχαν λάβει για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της παρακολούθησης είτε με τον μοναδικό anti-TNFα παράγοντα που έλαβαν κατά τη διάρκεια της μελέτης. Αυτή η ανάλυση έγινε προκειμένου να ληφθούν υπόψη και οι ασθενείς που έλαβαν  $\geq 1$  anti-TNFα το χρονικό διάστημα που



μεσολάβησε μεταξύ των ελέγχων. Όταν στην ανάλυση συμπεριελήφθησαν μόνο οι ασθενείς που έλαβαν έναν μόνο anti-TNFα παράγοντα κατά το έτος παρακολούθησης (n=64), τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια.

	Μονοπαράγοντική ανάλυση		Πολυπαράγοντική ανάλυση-1*		Πολυπαράγοντική ανάλυση-2†	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
Ηλικία >50 έτη	0.96 (0.338 to 2.73)	0.939	1.043 (0.259 to 4.21)	0.953	1.18 (0.296 to 4.73)	0.812
Φύλο	1.19 (0.409 to 3.44)	0.754	0.575 (0.105 to 3.15)	0.523	0.843 (0.179 to 3.97)	0.829
PA (vs μη-PA)	1.13 (0.398 to 3.2)	0.82	1.58 (0.304 to 8.15)	0.588	1.45 (0.284 to 7.45)	0.653
Πιθανή προηγούμενη έκθεση σε TB‡	2.88 (0.643 to 12.9)	0.167	6.1 (0.928 to 40.1)	0.06	<b>7.24</b> <b>(1.09 to 48)</b>	<b>0.04</b>
Προηγούμενος BCG εμβολιασμός	0.857 (0.262 to 2.81)	0.799	0.554 (0.143 to 2.15)	0.393	0.556 (0.142 to 2.18)	0.399
Κορτικοστεροειδή ή DMARDs	0.722 (0.239 to 2.19)	0.564	0.25 (0.047 to 1.32)	0.103	0.265 (0.052 to 1.35)	0.109
Adalimumab/ άλλοι anti-TNFs	1.088 (0.376 to 3.14)	0.877	1			
Infliximab	<b>0.123</b> <b>(0.015 to 1.003)</b>	<b>0.05</b>	<b>0.048</b> <b>(0.004 to 0.583)</b>	<b>0.017</b>	<b>0.031</b> <b>(0.002 to 0.414)</b>	<b>0.009</b>
Etanercept	3.31 (0.979 to 11.2)	0.054	2.68 (0.629 to 11.5)	0.182		

## Πίνακας 10. Στατιστική ανάλυση

\*Μοντέλο 1: Όλοι οι anti-TNF παράγοντες συμπεριελήφθησαν στην ανάλυση. Η χρήσηadalimumab,golimumab ή certolizumab συμπεριλήφθηκε ως πρότυπο αναφοράς.

†Μοντέλο 2 : Μόνο το infliximabσυμπεριελήφθηκε στην ανάλυση.

‡Πιθανή προηγούμενη έκθεση στο μυκοβακτηρίδιο: Πιθανή έκθεση στο απώτερο παρελθόν ή διαμονή/γέννηση σε χώρα υψηλού επιπολασμού της TB

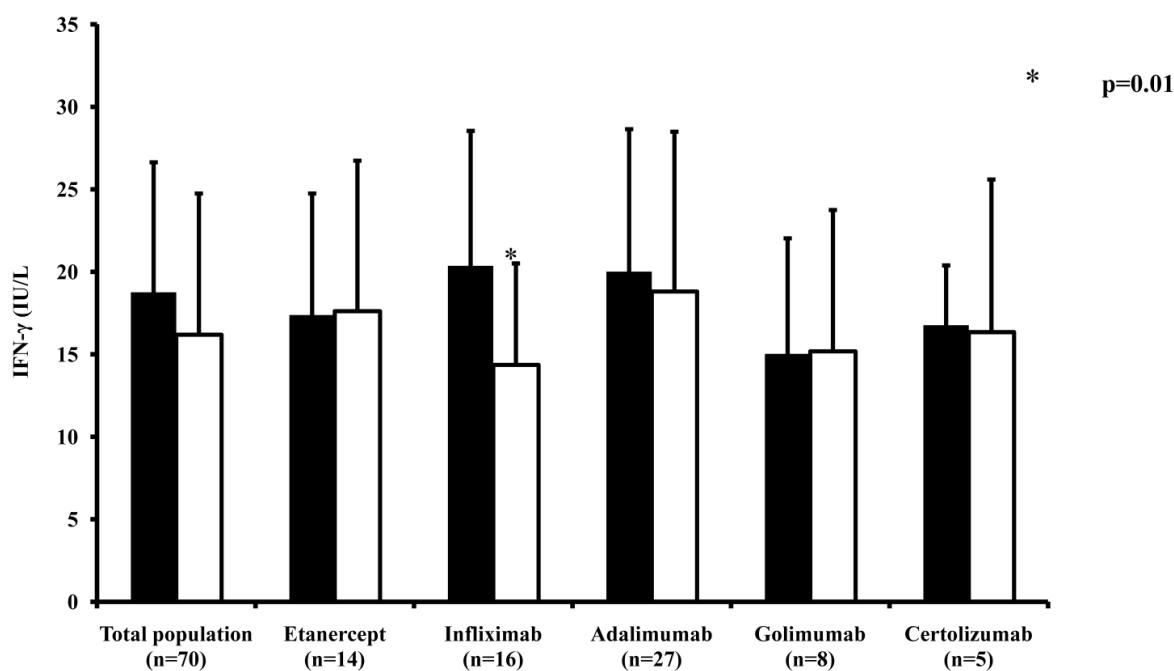
DMARDs, τροποποιητικά της νόσου φάρμακα, PA, ρευματοειδής αρθρίτιδα, TB φυματίωση, TNFπαράγοντας νέκρωσης του όγκου.

Οι τιμές στατιστικής σημαντικότητας ( $p < 0.05$ ) είναι σημασμένες με έντονους χαρακτήρες.

## Η επίδραση της αγωγής με anti-TNFα παράγοντες στην *in vitro* απελευθέρωση IFN-γ.

Η αγωγή με anti-TNFα παράγοντες θα μπορούσε να επηρεάσει άμεσα την παραγόμενη IFN-γ, την οποία μετρούμε *in vitro* με IGRAs. Για να ελέγξουμε την υπόθεση αυτή, συγκρίναμε την επαγόμενη από το μιτογόνο απελευθέρωση της IFN-γ, η οποία αντιστοιχεί στο μέγιστο της παραγωγής IFN-γ, κατά τον αρχικό έλεγχο και στο τέλος του ενός έτους αγωγής.

Σε όλους τους ασθενείς παρατηρήθηκε μία μικρή αλλά στατιστικώς σημαντική μείωση στην απελευθέρωση IFN-γ (από  $18.8 \pm 7.9$  IU/L σε  $16.2 \pm 8.6$  IU/L,  $p=0.034$ ) μετά τη λήψη anti-TNFα παραγόντων. Αυτή η μείωση αφορούσε κυρίως ασθενείς που είχαν λάβει αγωγή με infliximab ( $p=0.01$ ). (Εικόνα 17)



**Εικόνα 19. Επίπεδα INF-γ.** Τα επίπεδα INF-γ, όπως μετρήθηκαν μετά την επώαση με μιτογόνο με τη δοκιμασία QFT-GIT, κατά τον αρχικό έλεγχο των ασθενών (συμπαγείς ράβδοι) και ένα έτος μετά ενώ οι ασθενείς ελάμβαναν αγωγή με anti-TNFα παράγοντες (λευκές ράβδοι).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προοπτική μελέτη στη διεθνή βιβλιογραφία που μελέτησε τη συχνότητα θετικοποίησης των δοκιμασιών ελέγχου για TB σε ρευματολογικούς ασθενείς που έλαβαν αγωγή με anti-TNFα παράγοντες και οι οποίοι κατά τον αρχικό προληπτικό έλεγχο είχαν βρεθεί αρνητικοί με όλες τις διαθέσιμες δοκιμασίες ελέγχου (TST, T.SPOT-TB, QFT-GIT).

Η μελέτη κατέδειξε ότι ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών θετικοποιεί τα αποτελέσματα μίας τουλάχιστον δοκιμασίας ελέγχου για φυματίωση κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου αγωγής με anti-TNFα παράγοντες. Το ποσοστό των ασθενών αυτών κυμάνθηκε από 21-29% (ανάλογα με τα κριτήρια θετικοποίησης των δοκιμασιών). Τα αποτελέσματα αυτά έχουν σημαντικές επιπτώσεις στον τρόπο με τον οποίο μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτές οι δοκιμασίες για την παρακολούθηση των ασθενών υπό αγωγή με αντι-TNFα παράγοντες στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες ότι ένα μικρό ποσοστό ασθενών που λαμβάνουν αγωγή με anti-TNFα παράγοντες αναπτύσσουν ενεργό φυματίωση, παρά το γεγονός ότι έχουν υποβληθεί στον κατάλληλο έλεγχο για λανθάνουσα φυματίωση πριν την έναρξη της αγωγής. (175-178) Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται: α) σε νέα έκθεση στο *M. Tuberculosis* κατά τη διάρκεια της αγωγής (συνηθέστερη αιτία) ή β) σε αναζωπύρωση λανθάνουσας φυματίωσης η οποία δεν διαγνώστηκε στον αρχικό έλεγχο («ψευδώς αρνητική» TST ή IGRAs). Ο κίνδυνος αυτός σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με anti-TNFα παράγοντες έχει υπολογιστεί ότι κυμαίνεται από 0,2 - 4%.(176-178).

Σε μία παλαιότερη μελέτη, όπου είχε χρησιμοποιηθεί μόνο η TST, υπήρχαν 6 περιπτώσεις με TB μεταξύ 1059 ασθενών (0,6%) που ελάμβαναν αγωγή με infliximab, ενώ σε μία πιο πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκαν 4 περιπτώσεις TB μεταξύ 1893 ασθενών (0,2%), οι οποίοι ελάμβαναν αγωγή με golimumab και είχαν ελεγχθεί με τις μεθόδους TST και QFT-GIT πριν την έναρξη της μελέτης (177). Σε μία παρόμοια μελέτη, που διεξήχθη σε χώρα με όπου η φυματίωση είναι ενδημική (Ταϊβάν), υπήρχαν 6 περιπτώσεις TB

μεταξύ 150 ασθενών (4%) με αρνητικό προσυμπτωματικό έλεγχο με TST και QFT-G.(178). Πέντε από τους 6 ασθενείς ανέπτυξαν ενεργό φυματίωση μετά από 20-24 μήνες θεραπείας, γεγονός ενδεικτικό νέας έκθεσης σε *M. Tuberculosis*.

Πρόσφατα τόσο το Αμερικανικό Κολέγιο Ρευματολόγων (ACR) όσο και μία ομάδα ειδικών στις επικαιροποιημένες οδηγίες για τη χρήση των βιολογικών παραγόντων σε ρευματολογικούς ασθενείς, συνέστησαν την επανάληψη του ελέγχου για TB σε ασθενείς οι οποίοι έχουν παράγοντες κινδύνου για TB και αρνητικό προσυμπτωματικό διαγνωστικό έλεγχο είτε με TST είτε με τις IGRAs. (175). Επιπρόσθετα, το Αμερικανικό Κολέγιο Ρευματολόγων συνέστησε να διενεργείτε επαναληπτικός προσυμπτωματικός έλεγχος ετησίως σε εκείνους τους ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα οι οποίοι διαβιούν, ταξιδεύουν ή εργάζονται σε περιβάλλον όπου είναι πιθανή η έκθεση σε MTB ενώ συνεχίζουν παράλληλα να λαμβάνουν αγωγή με anti-TNFα.

Ωστόσο, και οι δύο περιπτώσεις είχαν level of evidence C, γεγονός ενδεικτικό της απουσίας επαρκώς σχεδιασμένων τυχαιοποιημένων ή μη τυχαιοποιημένων μελετών, οι οποίες να στηρίζουν αυτές τις συστάσεις(162;163).

Επίσης, είναι λίγες οι προοπτικές μελέτες που σκοπό έχουν την εκτίμηση της απόδοσης του επαναληπτικού προσυμπτωματικού ελέγχου σε ασθενείς οι οποίοι βρίσκονται υπό αγωγή με anti-TNF παράγοντες.(177) Η συχνότητα θετικοποίησης των δοκιμασιών ελέγχου ποικίλει για την TST από 0 - 37%(179-183), για την QFT-G από 4 - 12% (179;181), για την QFT-GIT από 0-12% (182-185) και για την T-SPOT.TB από 0 - 10,5% (186) (με διάρκεια παρακολούθησης από 3 μήνες έως και περισσότερο από 3 χρόνια). Γενικότερα, παρατηρείται αυξημένη συχνότητα θετικοποίησης των αποτελεσμάτων σε χώρες όπου ο επιπολασμός της νόσου είναι μεγάλος. Για παράδειγμα, η συχνότητα θετικοποίησης της TST κυμαίνεται από 0 - 12% σε χώρες με χαμηλό επιπολασμό της νόσου, όπως η Ιταλία(181;183) και η Αυστρία(184) ενώ αυξάνεται από 25-37% σε χώρες με αυξημένο επιπολασμό, όπως η Τουρκία(182), η Ταιβαν (179) και η Κορέα.(180). Καμία από αυτές τις μελέτες δεν αξιολόγησε ταυτόχρονα και τις τρεις διαθέσιμες μεθόδους και δεν αναγνωρίστηκε κανένας παράγοντας κινδύνου για την

θετικοποίηση των δοκιμασιών, με εξαίρεση μία μελέτη όπου η χορήγηση anti-TNF παραγόντων για περισσότερα από τρία χρόνια συσχετίστηκε με θετικοποίηση της TST(180).

Το ενδιαφέρον για την κλινική χρησιμότητα της θετικοποίησης των αποτελεσμάτων των μεθόδων απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ(IGRAs) κατά την επανάληψή τους είναι μεγάλο. Τα περισσότερα από τα διαθέσιμα δεδομένα για αυτές προέρχονται από μεγάλης κλίμακας μελέτες που αφορούν υγιείς εργαζόμενους στον τομέα της υγείας. Σε αυτές τις μελέτες η συχνότητα θετικοποίησης ποικίλλει από 0,7-14,4% για την QFT-GIT ενώ για την T-SPOT.TB η συχνότητα κυμαινόταν από 3,9-4,9%(187).

Σε μία πρόσφατη μελέτη από τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής τα θετικά αυτά αποτελέσματα των IGRAs αρνητικοποιήθηκαν σε επαναληπτικό έλεγχο που διεξήχθη 6 μήνες αργότερα από 76-77%(133). Λόγω αυτών των μεταβολών, οι οποίες συχνότερα παρατηρούνται στα όρια των τιμών μεταξύ θετικού και αρνητικού αποτελέσματος, σε κάθε μέθοδο προτάθηκαν αυστηρότερα κριτήρια για την αξιολόγησήκατά τον επαληπτικό έλεγχο τα οποία όμως δεν έχουν επαρκώς αξιολογηθεί στην κλινική πράξη.(172-174)

Η μελέτη μας έδειξε ότι ~10%/έτος των ασθενών εμφανίζουν θετικοποίηση σε τουλάχιστον μία μέθοδο υπό αγωγή με anti-TNF παράγοντες. Όταν τα αποτελέσματα των μεθόδων αξιολογήθηκαν με τη χρήση των αυστηρότερων κριτηρίων που έχουν προταθεί η θετικοποίηση κυμαινόταν μεταξύ 3-10%. Θετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν συχνότερα με την TST (13% ή 10% ανάλογα με τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν), λιγότερα συχνά με την T-SPOT.TB( 10% ή 7% αντίστοιχα) ενώ για την QFT-GIT ήταν ακόμα λιγότερο συχνά (7% ή 3% αντίστοιχα). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο ένας ασθενής που καταγόταν από χώρα με υψηλή ενδημικότητα για την TB εμφάνισε ταυτόχρονη θετικοποίηση σε περισσότερες από μία μεθόδους (TST και QFT-GIT).

Ωστόσο, ένας ασθενής που επιβεβαιωμένα εκτέθηκε στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης ενώ βρισκόταν υπό αγωγή με anti-TNF παράγοντα, θετικοποίησε την δοκιμασία T-SPOT.TB. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι πιθανώς να χρειάζεται και κατά τον επανέλεγχο δύο μέθοδοι όπως κατά τον προσυμπτωματικό διαγνωστικό έλεγχο. Αν εφαρμόσουμε μία τέτοια οδηγία (TST και μία IGRA), η συχνότητα θετικών αποτελεσμάτων θα

κυμαίνεται από 21-23% (17-19% με τα αυστηρότερα κριτήρια που έχουν προταθεί για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων κατά τον επανέλεγχο). Στην περίπτωση αυτή, ένας στους πέντε ασθενείς με αρνητικό προσυμπτωματικό έλεγχο θα πρέπει να λάβει προφυλακτική αγωγή με ισονιαζίδη σύμφωνα με τις υπάρχουσες οδηγίες.

Η κλινική σημασία της θετικοποίησης των μεθόδων της TST ή/και των IGRAs δεν είναι ακόμη ευκρινής. Πρέπει να διευκρινιστεί αν αυτά τα αποτελέσματα είναι «αληθώς θετικά» (ενδεικτικά λανθάνουσας φυματίωσης) ή «ψευδώς θετικά». Σε μία Ιταλική μελέτη μεταξύ των 6 ασθενών που θετικοποίησαν την QFT-GIT μετά από 12 μήνες αγωγής με anti-TNF παράγοντες, μόνο 2 (33%) παρέμειναν με θετικό αποτέλεσμα μετά από 6 μήνες κατά τη διάρκεια του επανάληψης της διαγνωστικής δοκιμασίας (183). Σε μια άλλη πρόσφατη μελέτη, σε επανέλεγχο 249 αρνητικών στον πρώτο έλεγχο ασθενών, 34 (13.6%) είχαν μετατροπή μίας τουλάχιστον δοκιμασίας [6 (16.2%) είχαν λάβει abatacept, 7 (15.9%) tocilizumab, και 21 (12.5%) anti-TNF)]. Κανείς από τους ασθενείς αυτούς δεν ανέπτυξε φυματίωση (188).

Η πιθανότητα η θετικοποίηση των δοκιμασιών αυτών να οφείλεται σε φαινόμενο «ενίσχυσης» (boostereffect) μετά την χορήγηση TST, είναι μικρή μια και ο επαναληπτικός έλεγχος διενεργήθηκε ένα έτος αργότερα. Σε μία συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας με αντικείμενο την θετικοποίηση των IGRAs μετά από TST, από τις 13 μελέτες που εντάχθηκαν, στις 5 δεν εμφανίσθηκε «φαινόμενο ενίσχυσης», ενώ στις υπόλοιπες 8 οι επαναλήψεις διενεργήθηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την TST (< 4 μήνες). (189) Ακόμα και σε αυτές τις μελέτες το «φαινόμενο ενίσχυσης» παρατηρήθηκε κυρίως σε ασθενείς που είχαν θετικές IGRAs κατά τον αρχικό έλεγχο. Στη μόνη μακράς διάρκειας μελέτη, δεν παρατηρήθηκε «φαινόμενο ενίσχυσης» στη μέθοδο T-SPOT.TB η οποία διενεργήθηκε ακόμα και δύο έτη μετά την επαναληπτική TST (190).

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε προσπάθεια να αναγνωριστούν πιθανοί παράγοντες που να συσχετίζονται με τη θετικοποίηση των τριών μεθόδων, αν και ο αριθμός των ασθενών που εντάχθηκαν στη μελέτη μας ήταν μικρός. Τόσο η μονοπαραγοντική όσο και η πολυπαραγοντική ανάλυση που διενεργήθηκαν ανέδειξαν πως μόνο η αγωγή με infliximab συσχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο θετικοποίησης των δοκιμασιών. Αντιθέτως, η αγωγή με

etanercept φαίνεται πως αυξάνει αυτόν τον κίνδυνο, αν και η μεταβολή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική.

Αυτή η παρατήρηση είναι ιδιαίτερος σημαντική, αφού είναι ευρέως γνωστό ότι ο κίνδυνος για αναζωπύρωση της λανθάνουσας φυματίωσης θεωρείται υψηλότερος για το infliximab σε σύγκριση με τον κίνδυνο αναζωπύρωσης από την αγωγή με etanercept.(191) Αν και η ερμηνεία αυτής της παρατήρησης δεν είναι ξεκάθαρη, πιθανόν μπορεί να αποδοθεί στην κατασταλτική επίδραση του infliximab στα επίπεδα της ιντερφερόνης- $\gamma$  που απελευθερώνεται *invitro*. Πράγματι, όταν τα επαγόμενα από το μιτογόνο επίπεδα της ιντερφερόνης- $\gamma$  συγκρίθηκαν πριν και μετά τη αγωγή, μόνο η θεραπεία με infliximab μείωσε στατιστικά σημαντικώς την παραγόμενη IFN- $\gamma$ .

Επίσης, ενώ στην παρούσα μελέτη υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη λήψη κορτικοστεροειδών μεταξύ του αρχικού και δεύτερου ελέγχου για LTBI ή μεταξύ των ασθενών με μετατροπή ή μη των δοκιμασιών, έχει φανεί ότι τόσο τα κορτικοστεροειδή όσο και το infliximab μειώνουν την απόδοση των IGRA δοκιμασιών.(166;192)

Η μελέτη μας έχει κάποιους περιορισμούς όπως ο μικρός αριθμός ασθενών που εντάχθηκαν σε αυτή και η απουσία επανελέγχου μετά το πρώτο έτος αγωγής που ήταν το καταληκτικό σημείο. Βέβαια ο επανέλεγχος μετά το πρώτο έτος θα είχε μικρή διαγνωστική αξία, αφού 40% των ασθενών που εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα στον αρχικό επανέλεγχο έλαβαν αγωγή με ισονιαζίδη. Προφυλακτική αγωγή χορηγήθηκε μόνο σε περιπτώσεις που υπήρχε ισχυρή κλινική υποψία με βάση το ιστορικό, τα κλινικά και τα ακτινολογικά ευρήματα. Επίσης, η μελέτη διενεργήθηκε σε μία χώρα όπου παρατηρείται αυξημένος επιπολασμός προηγούμενης έκθεσης στο μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης, συνεπώς είναι πιθανόν τα ευρήματα της μελέτης να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε χώρες με χαμηλή ενδημικότητα της φυματίωσης.(166) Επιπρόσθετα, αφού ο πληθυσμός που επιλέχθηκε είχε αρνητικές όλες της μεθόδους του προσυμπτωματικού διαγνωστικού ελέγχου είναι πιθανό να έχει αυξηθεί ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα κατά των επανελέγχου.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι IGRAs μπορεί να παρουσιάσουν προβλήματα αναπαραγωγιμότητας και επαναληψιμότητας, στη συγκεκριμένη



όμως μελέτη η διαδικασία των δοκιμασιών ήταν σταθερή. Κάποιοι από τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την μέτρηση και την παραγωγή ιντερφερόνης-γ όπως σφάλματα κατά την αιμοληψία, ανάδευση, μεταφορά και επώαση του δείγματος στη μελέτη αυτή δεν είναι πιθανό να οδήγησαν στην ορομετατροπή καθώς οι προτεινόμενες από τους κατασκευαστές συνθήκες τηρήθηκαν αυστηρά και στις δύο χρονικές στιγμές. Επίσης σταθερός ήταν και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε ο οποίος είχε διακριβωθεί στον προβλεπόμενο χρόνο. Ποιοτικά προβλήματα συγκεκριμένων σειρών παραγωγής (kitlotnumbers) και αναλυτικά τυχαία σφάλματα δεν είναι δυνατό να προβλεφθούν και είναι πιθανό να παίζουν κάποιο μικρό ρόλο σε διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων.(193-200)

Πρόσφατα έγινε διαθέσιμη για κλινική χρήση μία νέα έκδοση της δοκιμασίας QuantiferonGold με την ονομασία QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA (Celestis/Qiagen, Carnegie, Australia), η οποία περιέχει επιπλέον πεπτιδία που προκαλούν ανοσολογική απάντηση από τα CD8+ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Η νέας γενιάς IGRA-ELISA παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με την προηγούμενη, ιδιαίτερα σε ανοσοκατασταλμένα άτομα.(201;202) Για την ορομεταστροφή της νεότερης αυτής εξέτασης υπό αντι-TNF δεν υπάρχουν δεδομένα και θα πρέπει να διενεργηθούν μελέτες με αυτό το αντίκειμενο.

Συμπερασματικά, η προοπτική αυτή συγκριτική μελέτη μας, έδειξε ότι οι ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή με αναστολείς του παράγοντα νέκρωσης του όγκου έχουν ~10% ετήσιο κίνδυνο θετικοποίησης των δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται για τον προσυμπτωματικό διαγνωστικό έλεγχο για τη φυματίωση. Αν χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα δύο μέθοδοι για τον έλεγχο ( η δερματική φυματινοαντίδραση και μία από τις μεθόδους απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ) ο κίνδυνος αυξάνει σε 20%, ενώ αυξάνει ακόμη περισσότερο σε 30% αν χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα και οι τρεις μέθοδοι (η δερματική φυματινοαντίδραση και οι δύο εργαστηριακές μέθοδοι απελευθέρωσης ιντερφερόνης-γ).

Συνυπολογίζοντας τον κίνδυνο που προκύπτει για τους ασθενείς μας αν δεν διαγνώσουμε εγκαίρως είτε μία νέα λοίμωξη από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης είτε μία αναζωπύρωση της λοίμωξης, στο κέντρο μας

χρησιμοποιούμε δύο μεθόδους, την δερματική φυματινοαντίδραση και μίας από τις εργαστηριακές μεθόδους απελευθέρωση ιντερφερόνης- $\gamma$ , με συνέπεια να αυξάνεται σημαντικά η πιθανότητα να διαγνώσουμε τη λοίμωξη από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης. Εν τούτοις, απαιτούνται προοπτικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών ώστε να υπολογιστεί ο κίνδυνος εμφάνισης φυματίωσης στους ασθενείς εκείνους που θετικοποίησαν μία τουλάχιστον μέθοδο, πριν προταθούν νέες κατευθυντήριες οδηγίες.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### Μελέτη της λοίμωξης από το μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης σε ασθενείς με αυτοάνοσες ρευματικές παθήσεις

**Σκοπός** της παρούσας μελέτης ήταν να μελετηθεί η συχνότητα θετικοποίησης των δοκιμασιών για φυματίωση (TB) (TST, IGRAs) κατά τη διάρκεια αγωγής με anti-TNF παράγοντες σε ασθενείς με αρνητικό έλεγχο προ της έναρξης αγωγής.

**Μέθοδοι** Πρόκειται για μια προοπτική μελέτη ασθενών με ρευματικές παθήσεις με αρνητικό αρχικό έλεγχο (δερματική φυματινοαντίδραση (TST <5 mm) και αρνητικές μέθοδοι T-SPOT.TB, Quantiferon-TB Gold In Tube(QFT-GIT) και ακτινογραφία θώρακα) και οι οποίοι υποβλήθηκαν σε αγωγή με anti-TNF παράγοντες. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε επαναληπτικό έλεγχο για TB ένα έτος μετά. Παράγοντες που σχετίζονται με τη μετατροπή των δοκιμασιών της TB αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ εκείνων που «θετικοποίησαν» και εκείνων που «δεν θετικοποίησαν»

**Αποτελέσματα:** 70 ασθενείς (μέση τιμή ηλικίας  $50\pm 15,5$  έτη) με ρευματολογικές παθήσεις (33 με ρευματοειδή αρθρίτιδα, 33 με σπονδυλοαρθροπάθειες και 4 με άλλες νόσους) συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη. Οι ασθενείς έλαβαν αγωγή με διάφορους anti-TNF παράγοντες (27 έλαβαν adalimumab, 14 etanercept, 16 infliximab, 8 golimumab, 5 certolizumab pegol) για ένα έτος. 12 μήνες μετά παρατηρήθηκε σε είκοσι ασθενείς (29%) τροποποίηση (θετικοποίηση) σε μία τουλάχιστον μέθοδο ελέγχου : θετικοποίηση στην TST παρατηρήθηκε σε 9 (13%), T-SPOT.TB σε 7 (10%) και QFT-GIT σε 5 (7%) ασθενείς. Μόνο ένας ασθενής παρουσίασε ταυτόχρονη θετικοποίηση περισσότερων από μία μεθόδους. Η μονοπαραγοντική και η πολυπαραγοντική ανάλυση ανέδειξαν ότι μόνο το infliximab συσχετίστηκε με μειωμένη συχνότητα θετικοποίησης των μεθόδων ελέγχου για TB (OR 0.048, 95% CI 0.004 έως 0.606,  $p=0.017$ ). Κανείς ασθενής (40% έλαβαν αγωγή με ισονιαζίδη) δεν νόσησε από ενεργό φυματίωση κατά τη διάρκεια παρακολούθησης ( $27\pm 12$  μήνες).

**Συμπεράσματα** Περίπου ένα τρίτο των ασθενών με αρνητικό προσυμπτωματικό έλεγχο για φυματίωση παρουσιάζουν μετατροπή μίας τουλάχιστον μεθόδου κατά τη διάρκεια αγωγής με anti-TNF παράγοντες. Τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τον σχεδιασμό των επαναληπτικών δοκιμασιών καθώς και για τη χορήγηση προφυλακτικής αντιφυματικής αγωγής.

**Λέξεις ευρετηριασμού:** anti-TNF, φυματίωση, δερματική φυματινοαντίδραση, T-SPOT.TB, QuantiFERON-TB

## ABSTRACT

### **Study on Mycobacterium tuberculosis infection in patients with autoimmune rheumatic diseases**

**Objectives:** The determination of the rate of tuberculosis (TB) screening test conversion during anti-tumour necrosis factor (TNF) therapy in rheumatic patients with negative baseline screening.

**Methods:** Prospective study of rheumatic patients with negative baseline TB screening (tuberculin skin test (TST): <5 mm, and negative T-SPOT.TB, QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFT-GIT) and chest X-ray) treated with anti-TNF agents. All patients underwent re-screening for TB with all assays 1 year later. Factors associated with TB test conversion were analysed and compared between 'converters' and 'non-converters'.

**Results:** Seventy patients (mean age 50.6±15.5 years) with rheumatic disease (33 with rheumatoid arthritis, 33 with spondyloarthropathies and 4 with other conditions) were enrolled. Patients were treated with different anti-TNFs (27 with adalimumab, 14 etanercept, 16 infliximab, 8 golimumab, 5 certolizumab pegol) for 1 year. Twenty patients (29%) displayed conversion of at least one screening assay 12 months after anti-TNF therapy: conversion of TST occurred in 9 (13%), T-SPOT.TB in 7 (10%) and QFT-GIT in 5 (7%). Only one patient had concomitant conversion of more than one screening test. Univariate and multivariate analysis revealed that only infliximab was associated with a decreased rate of TB screening assay conversion (OR 0.048, 95% CI 0.004 to 0.606, p=0.017). No patient (40% received isoniazid therapy) developed active TB during follow-up (27±12 months).

**Conclusions:** Approximately one third of patients with negative baseline TB screening develop conversion of at least one screening test during anti-TNF treatment. These findings should be considered when designing rescreening strategies and contemplating latent TB therapy.

**Key words:** anti-TNF, tuberculosis, Tuberculin skin test, T-SPOT.TB, QuantiFERON-TB

## Reference List

- (1) Burton W, Morrison A, Maclean R, Ruderman E. Systematic review of studies of productivity loss due to rheumatoid arthritis. *Occupational Medicine* 2005; 56:18-27.
- (2) Σιδηρόπουλος Π, Φραγκούλη Ε, Αυγουστίδης Ν, Φανουριάκης Α. Εγχειρίδιο Χρήσης Βιολογικών Παραγόντων Στην Κλινική Πράξη. Επικαιροποίηση 2016 ed. 2016.
- (3) Singh JA, Saag KG, Aklonis S. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2016; 61(1):1-26.
- (4) Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10:45-65.
- (5) Hehlhans T, PK. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20. 2005.
- (6) Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11, 372-77. 2003.
- (7) Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53:45-53.
- (8) Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 1997; 385:729-733.
- (9) Eck MJ, Prang SR. The structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 1989; 264:17595-17605.
- (10) Aversa G, Punnonen J, DeVries JE. The 26-kD transmembrane form of tumor necrosis factor  $\alpha$  on activated CD4<sup>+</sup> T cell clones provides a costimulatory signal for human B cell activation. *J Exp Med* 1993; 177(1575):1585.
- (11) Harashima S, Horiuchi T, Hata Neal. Outside-to-inside signaling through the membrane TNF- $\alpha$  induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2001; 166:130-136.
- (12) Mitoma H, Horiuchi T, Hata Neal. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- $\alpha$ . *Gastroenterology* 2005; 128:376-392.
- (13) Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to Listeria monocytogenes infection. *Cell* 1993; 73:457-467.
- (14) Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL et al. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol* 1998; 160:943-952.

- (15) Grell M, Douni E, Wajant H. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; 83:793-802.
- (16) Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:185-191.
- (17) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178: 2249-54. *J Exp Med* 1993; 178:2249-2254.
- (18) Bean AG, Roach DR, Briscoe H. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 1999; 162:3504-3511.
- (19) Mohan VP, Scanga CA, Yu K. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun* 2001; 69:1847-1855.
- (20) Flynn JL, Goldstein MM, Chan J. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2:561-572.
- (21) Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 2002; 168:4620-4627.
- (22) Saunders BM, Tran S, Ruuls S, Sedgwick JD, Briscoe H, Britton WJ. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2005; 174:4852-4859.
- (23) Erickson SL, Sedgwick JD, Keal. Decreased sensitivity to tumor necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 1994; 372:560-633.
- (24) Everest PR, McGhee J. Susceptibility to *Salmonella typhimurium* infection and effectiveness of vaccination in mice deficient in the tumor necrosis factor alpha p55 receptor. *Infect Immun* 1998; 66: 3355-64. *Infect Immun* 1998; 66:3355-3364.
- (25) Rothe J, Lesslauer W, Lotscher H. Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993; 364: 798-802. *Nature* 1993; 364:798-802.
- (26) Ehlers S, Holscher C, Scheu S. The lymphotoxin beta receptor is critically involved in controlling infections with the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 2003; 170:5210-5218.
- (27) Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, Britton WJ. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 2001; 193:239-246.

- (28) Bopst M, Garcia I, Guler R, et al. Differential effects of TNF and LT $\alpha$  in the host defense against M bovis BCG. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1935-43. *Eur J Immunol* 2001; 31:1935-1943.
- (29) Olleros ML, Guler R, Vesin Deal. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against Mycobacterium bovis bacillus Calmette-guerin and Mycobacterium tuberculosis infections. *Am J Pathol* 2005; 166:1109-1120.
- (30) Alexopoulou L, Kranidioti K, Xanthoulea Seal. Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity. *Eur J Immunol* 2006; 36:2768-2780.
- (31) Musicki K, riscoe H, ran S, Britton WJ, unders BM. Differential requirements for soluble and transmembrane tumor necrosis factor in the immunological control of primary and secondary Listeria monocytogenes infection. *Infect Immun* 2006; 74:3180-3189.
- (32) Torres D, Janot L, Quesniaux V Feal. Membrane tumor necrosis factor confers partial protection to listeria infection. *Am J Pathol* 2005; 167:1677-1687.
- (33) Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R et al. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(3):148-155.
- (34) Taylor PC, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for RA. *Nat Rheumatol Rev* 2009; 5:578-582.
- (35) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991; 10(13):4025-4031.
- (36) Thalayasingam N, Isaacs J.D. N. Thalayasingam, J.D. Isaacs Anti-TNF therapy, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 25 (2011) 549–567 . *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2011; 25:549-567.
- (37) Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2007.
- (38) Scallon BJ, Moore MA, Trinh H, Knight DM, Ghayeb J. Chimeric anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF- $\alpha$  and activates immune effector functions. *Cytokine* 1995; 7:251-259.
- (39) Anolik JH, Ravikumar R, Barnard J, Owen T, Almudevar A, Milner EC et al. Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks. *J Immunol* 2008, 180:688-692 ) 2008; 180:688-692.
- (40) Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi S, Wolf DG, Baerd RD et al. Etanercept for active Crohn's : a randomized, double-blind, placebo-control trial. *Gastroenterology* 2001; 121(5):1088-1094.
- (41) Etanercept plus standard therapy for Wegener's granulomatosis. *The New England Journal of Medicine* 2005; 352(4):351-361.

- (42) Utz JP, Limper AH, Kalra S, Specter U, Scott JP, Vuk-Pavlovic Z et al. Etanercept for the treatment of stage II and III progressive pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2003; 124(1):177-185.
- (43) Baughman RP, Lower EE, Bradley DA, Raymond LA, Kaufman A. Etanercept for refractory ocular sarcoidosis: results of a double-blind randomized trial. *Chest* 2005; 128(2):1047-1062.
- (44) Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10:308-315.
- (45) Koo S, Marty FM, Baden LR. Infectious complications associated with immunomodulating biologic agents. *Am J Med* 2010; 124(2):285-306.
- (46) Allendoerfer R, Deepe GS Jr. Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms. *J Immunol* 1998; 160(12):6072.
- (47) Huffnagle GB, Toews GB, Burdick MD, Boyd MB, McAllister KS, McDonald RA et al. Afferent phase production of TNF-alpha is required for the development of protective T cell immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 1996; 157(10):4529.
- (48) Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(15):8093.
- (49) Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF-alpha in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol* 1999; 162(3):1633.
- (50) Randhawa PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology* 1990; 22(3):153.
- (51) Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2012; 64(5):625-639.
- (52) Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 59(6):762.
- (53) Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345(15):1098-1104.
- (54) Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to



significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8):2122-2127.

- (55) Fonseca JE, Canhyo.H., Silva C, Miguel C, Mediavilla MJ, Teixeira A et al. Tuberculosis in rheumatic patients treated with tumour necrosis factor alpha antagonists: the Portuguese experience. *Acta Reumatol Port.* 2006;31(3):247.) . *Acta Reumatol Port* 2006; 31(3):247.
- (56) Brassard P, Kezouh A, Suissa S. Antirheumatic drugs and the risk of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2006; 43(6):717.
- (57) Wallis RS, Broder MS, Wong JY, Hanson ME, Beenhouwer DO. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis* 2004; 38(9):1261-1265.
- (58) Askling J, Fored CM, Brandt L, Baecklund E, Bertilsson L, Coster L et al. Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden. *Arthritis Rheum* 2005; 52(7):1986-1992.
- (59) Dixon WG, Watson K, Lunt M, Hyrich KL, Silman AJ, Symmons DP et al. Rates of serious infection, including site-specific and bacterial intracellular infection, in rheumatoid arthritis patients receiving anti-tumor necrosis factor therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. 2006;54(8):2368.) . *Arthritis Rheum* 2006; 54(8):2368.
- (60) Tubach F, Salmon D, Ravaud P, Allanore Y, Goupille P, Breban M 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; 60(7):1884-1894.
- (61) Winthrop KL, Baxter R, Liu L, Varley CD, Curtis JR, Baddley JW et al. Mycobacterial diseases and antitumour necrosis factor therapy in USA. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(1):37-42.
- (62) Carmona L, Hernandez-Garcia C, Vadillo C, et al. Increased risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatology* 2003; 30:1436.
- (63) Arkema EV, Jonsson J, Baecklund E, et al. Are patients with rheumatoid arthritis still at an increased risk of tuberculosis and what is the role of biological treatments? *Ann Rheum Dis* 2015; 74:1212.
- (64) Wolfe F, Michaud K, Anderson J, Urbansky K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. *Arthritis Rheum* 2004; 50(2):372-379.
- (65) Mohan AK, Cote TR, Block JA, Manadan AM, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. *Clin Infect Dis* 2004; 39(3):295-299.
- (66) Dixon WG, Hyrich KL, Watson KD, et al. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the

British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). *Ann Rheum Dis* 2010; 69:522.

- (67) Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, Mola EM, Montero MD. BIOBADASER Group Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* 2003; 48(8):2122.
- (68) Tuberculosis associated with blocking agents against tumor necrosis factor-alpha--California, 2002-2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53(30):683-686.
- (69) Saliu OY, Sofer C, Stein DS, Schwander SK, Wallis RS. Tumor-necrosis-factor blockers: differential effects on mycobacterial immunity. *J Infect Dis* 2006; 194(4):486.
- (70) Hill PC, Brookes RH, Fox A, Fielding K, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D 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(7):966.
- (71) Greenwood D. Ιατρική Μικροβιολογία. Πασχαλίδης; 2010.
- (72) Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, Hoffmann C, Engelhardt H. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends in Microbiology* 2010; 18(3):109-116.
- (73) Boshoff HI, Barry CEI. Tuberculosis-metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:70-80.
- (74) Hernandez ea. Tuberculosis in the age of biologic therapy . *J AM ACAD DERMATOL* 2008.
- (75) C.D.C. Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. CDC 2013; Sixth Edition.
- (76) American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 161:1376-1395.
- (77) Schlossberg D. Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections . Fifth Edition ed. 2006.
- (78) Scaaf S, Zumla AI. Tuberculosis: A comprehensive clinical reference. 1<sup>st</sup> Edition ed. 2009.
- (79) Monir Madkour M, Warrell DA. Tuberculosis. 2004.
- (80) Murray JF. Bill Dock and the location of pulmonary tuberculosis: how bed rest might have helped consumption. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1029-1033.
- (81) Edwards D, Kirkpatrick CH. The immunology of mycobacterial diseases. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134:1062-1071.

- (82) American Thoracic Society, CDC. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161 S221-47.(4 Pt 2):221-247.
- (83) Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2018; 362:887-899.
- (84) Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol* 2005; 26:660-667.
- (85) Hartmann P, Plum G. Immunological defense mechanisms in tuberculosis and MAC-infection. *Diagn Microbio Infect Dis* 1999; 34:147-152.
- (86) Gonzalez-Cano P, Mondragon-Flores R, Sanchez-Torres LE, Gonzalez-Pozos S, Silva-Miranda M, Monroy-Ostria A et al. Mycobacterium tuberculosis H37Rv induces ectosome release in human polymorphonuclear neutrophils. *Tuberculosis* 2010; 90(2):125-134.
- (87) Guirado E, Schlesinger LS. Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front Immunol* 2013; 22(4):98.
- (88) Adams DO. The granulomatous inflammatory response. A review. *American Journal of Pathology* 1976; 84(1):164-192.
- (89) Sandor M, Weinstock JV, Wynn TA. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. *Trends in Immunology* 2003; 24(1):44-52.
- (90) Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunology* 2011; 4(3):252-260.
- (91) Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cellular Microbiology* 2007; 9(5):1087-1098.
- (92) Kirschner DE, Young D, Flynn JL. Tuberculosis: global approaches to a global disease. *Current Opinion in Biotechnology* 2010; 21(4):524-531.
- (93) Gonzalez-Juarrero M, Turner OC, Turner J, Marietta P, Brooks JV, Orme IM. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity* 2018; 3:1722-1728.
- (94) Puissegur MP, Botanch C, Duteyrat JL, Delsol G, Caratero C, Altare F. An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cellular Microbiology* 2004; 6(5):423-433.
- (95) Vos AM, Meima A, Verver S, Looman CWN, Bos.V., Borgdorff MW et al. High incidence of pulmonary tuberculosis persists a decade after immigration, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2004 2018; 10:736-739.

- (96) Zuber PL, McKenna MT, Binkin NJ, Onorato IM, Castro KG. Long-term risk of tuberculosis among foreign-born persons in the United States. *JAMA* 2018; 278:304-307.
- (97) Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunology* 2011; 4(3):271-278.
- (98) Huynh.K.K., Joshi SA, Brown EJ. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Current Opinion in Immunology* 2011; 23(4):464-472.
- (99) Day TA, Koch M, Nouailles G, et al. Secondary lymphoid organs are dispensable for the development of T-cell-mediated immunity during tuberculosis. *European Journal of Immunology* 2010; 40(6):1663-1673.
- (100) Davis JM, Clay H, Lewis JL, Ghorri N, Herbomel P, Ramakrishnan L. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity* 2002; 17(6):693-702.
- (101) Torrado E, Robinson RT, Cooper AM. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends in Immunology* 2011; 32(2):66-72.
- (102) Davis JM, Haake DA, Ramakrishnan L. *Leptospira interrogans* stably infects zebrafish embryos, altering phagocyte behavior and homing to specific tissues. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2009; 3(6):463.
- (103) Cosma CL, Humbert O, Ramakrishnan L. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nature Immunology* 2004; 5(8):828-835.
- (104) Egen G, Rothfuchs AG, C.G.Feng C.G., Winter N, Sher A, Germain RN. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity* 2008; 28(2):271-284.
- (105) Egen JG, Rothfuchs AG, Feng CG, Horwitz MA, Sher A, Germain RN. Intravital imaging reveals limited antigen presentation and T cell effector function in mycobacterial granulomas. *Immunity* 2011; 34(5):807-819.
- (106) Khader SA, Rangel-Moreno J, Fountain JJ, et al. In a murine tuberculosis model, the absence of homeostatic chemokines delays granuloma formation and protective immunity. *Journal of Immunology* 2009; 183(12):8004-8014.
- (107) Mattila JT, Diedrich CR, Lin PL, Phuah J. Simian immunodeficiency virus-induced changes in T cell cytokine responses in cynomolgus macaques with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are associated with timing of reactivation. *J Immunol* 2011; 186:3527-3537.
- (108) Dannenberg AMJr, Tomaszewski JFJr. Fishman's pulmonary diseases and disorders. New York: McGraw Hill; 1998. pp. 2447-71.). New York: McGraw Hill; 1998.
- (109) Zupiga J, Torres-Garcva D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna TS, Granados J, Yunis EJ. Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis. *Clin Dev Immunol* 2012.

- (110) Menon MPS. A new look at the immunology of tuberculosis. *Indian J Tuberc* 1997; 44:3-8.
- (111) Reggiardo Z, Middlebrook G. Failure of passive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974; 145:173-175.
- (112) Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. *Eu Respir J* 2010; 36:925-949.
- (113) Mack U, Migliori GB, Sester M, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2009; 33:956-973.
- (114) Comstock GW, Livesay VT, Woolpert SF. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol* 1974; 99:131-138.
- (115) Chaprman HJ, Lauzardo M. Advances in Diagnosis and Treatment of Latent Tuberculosis Infection. *J Am Board FM Med* 2014; 27:704-712.
- (116) Modlin RL, Bloom BR. TB or not TB: that is no longer the question. *Sci Transl Med* 2013; 5:2013-2016.
- (117) Achkar JM, Jenny-Avital ER. Incipient and subclinical tuberculosis: defining early disease states in the context of host immune response. *J Infect Dis* 2011; 204(4):1179-1186.
- (118) Zhang G, Zhou B, Li S, et al. Allelespecific induction of IL-1 $\beta$  expression by C/EBP $\beta$  and PU.1 contributes to increased tuberculosis susceptibility. *PLoS Pathog* 2014.
- (119) Orme IM. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis* 2014; 94:8-14.
- (120) 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; 163:1009-1021.
- (121) Shea KM, Kammerer JS, Winston CA, Navin TR, Horsburgh CR, Jr. Estimated rate of reactivation of latent tuberculosis infection in the United States, overall and by population subgroup. *Am J Epidemiol* 2014; 179:216-225.
- (122) Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989; 320:545-550.
- (123) Keane J, Bresnihan B. Tuberculosis reactivation during immunosuppressive therapy in rheumatic diseases: diagnostic and therapeutic strategies. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20(4):443-449.
- (124) Jick SS, Lieberman ES, Rahman MU, Choi HK. Glucocorticoid use, other associated factors, and the risk of tuberculosis. *Arthritis Rheum* 2006; 55:19-26.

- (125) Sidhu A, Verma G, Humar A, Kumar D. Outcome of latent tuberculosis infection in solid organ transplant recipients over a 10-year period. *Transplantation* 2014; 98:671-675.
- (126) Al-Anazi KA, Al-Jasser AM, Alsaleh K. Infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Front Oncol* 2018; 4:231.
- (127) Christopoulos AI, Diamantopoulos AA, Dimopoulos PA, Goumenos DS, Barbaliias GA. Risk factors for tuberculosis in dialysis patients: a prospective multi-center clinical trial. *BMC Nephrol* 2009; 10:36.
- (128) Corbett EL, Churchyard GJ, Clayton TC, et al. HIV infection and silicosis: the impact of two potent risk factors on the incidence of mycobacterial disease in South African miners. *AIDS* 2000; 14:2759-2768.
- (129) Baussano I, Williams BG, Nunn P, Beggiato M, Fedeli U, Scano F. Tuberculosis incidence in prisons: a systematic review. *PLoS Med* 2010; 7(12).
- (130) Moss AR, Hahn JA, Tulskey JP, Daley CL, Small PM, Hopewell PC. Tuberculosis in the homeless: a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 460-4. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:460-464.
- (131) Banfield S, Pascoe E, Thambiran A, Siafarikas A, Burgner D. Factors associated with the performance of a blood-based interferon-gamma release assay in diagnosing tuberculosis. *PLoS One* 2012; 7(6):e38556.
- (132) Katsenos S, ikolopoulou M, Gartzonika C, et al. Use of interferon-gamma release assay for latent tuberculosis infection screening in older adults exposed to tuberculosis in a nursing home. *J Am Geriatr Soc* 2011; 59: 858-62). *J Am Geriatr Soc* 2011; 59:858-862.
- (133) Dorman SE, Belknap R, Graviss EA, Reves R, Schluger N, Weinfurter P et al. Interferon-gamma Release Assays and Tuberculin Skin Testing for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Healthcare Workers in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(1):77-87.
- (134) Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: a systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med* 2008; 5(7): e152. *PLoS Med* 2008; 5(7):152.
- (135) C.D.C. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR* 2000; 49.
- (136) C.D.C. mmwr. [www cdc gov/mmwr](http://www.cdc.gov/mmwr) [ 2010 Available from: URL:[www.cdc.gov/mmwr](http://www.cdc.gov/mmwr)
- (137) O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:475-527.
- (138) Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:3-20.

- (139) Menzies D. Tuberculin skin testing. Tuberculosis: A comprehensive international approach. New York: 2000.
- (140) Howard A, Mercer P, Nataraj HC, Kang BC. Bevel-down superior to bevel-up in intradermal skin testing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018; 78:594-596.
- (141) American Thoracic Society. The tuberculin skin test. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124:346-351.
- (142) Poulsen A. Poulsen A. Some clinical features of tuberculosis. 1. Incubation period. *Acta Tuberc Scand* 1954; 24: 311–346. *Acta Tuberc Scand* 1954; 24:311-346.
- (143) Wasz-Hockert O. Wasz-Hockert O. On the period of incubation in tuberculosis. *Ann Med Fenn* 1947; 96: 764–772. *Ann Med Fenn* 1947; 96:764-772.
- (144) Wallgren A. The time-table of tuberculosis. *Tubercle* 1948; 29:245-251.
- (145) Madariaga.M.G., Jalali Z, Swindells S. Clinical utility of interferon gamma assay in the diagnosis of tuberculosis. *J Am Board Fam Med* 2007; 20:540-547.
- (146) Schluger NW. Advances in the diagnostics of latent tuberculosis infection. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; 34:60-66.
- (147) Hwang LY, Grimes CZ, Beasley RP, Graviss EA. Latent tuberculosis infections in hard-to-reach using population-detection, prevention and control. *Tuberculosis* 2009; 89(1):41-45.
- (148) Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356:1099-1104.
- (149) Hauck FR, Neese BH, Pancal AS, El-amin W. Identification and management of latent tuberculosis infection. *Am Fam Physician* 2009; 79:879-886.
- (150) Erkens CGM, et al. Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. *EurRespirJ* 2010; 36:325-349.
- (151) C.G.M.Erkens CGM, et al. Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. *Eur Respir J* 2010; 36:925-949.
- (152) Nayak S, Acharjya B. Mantoux test and its interpretation. *Indian Dermatology Online Journal* 2012; 3(1).
- (153) Al-Orainey IO. Diagnosis of latent tuberculosis: Can we do better? *Ann Thorac Med* 2009; 4(1):5-9.
- (154) Food and Drug Administration. QuantiFERON-TB- P010033. 2010.  
Ref Type: Online Source
- (155) Mazurek GH, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent Mycobacterium tuberculosis infection. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003; 52(RR-2):15-18.

- (156) Mazurek GH, Weis SE, Moonan PK. Prospective comparison of tuberculin skin test and two whole blood interferon-gamma release assays in tuberculosis suspects. *Clin Infect Dis* 2007; 45:837-845.
- (157) Food and Drug Administration. QuantiFERON-TB Gold - P010033/S006. 2010.  
Ref Type: Online Source
- (158) Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54(RR-15):49-55.
- (159) Food and Drug Administration. QuantiFERON-TB Gold In-Tube- P010033/S011. 2007.  
Ref Type: Online Source
- (160) Food and Drug Administration. T-SPOT-TB - P070006. 2008.  
Ref Type: Online Source
- (161) Kunst H. Diagnosis of latent tuberculosis infection : The potential role of new technologies. *Respiratory Medicine* 2006; 100:2098-2106.
- (162) Furst DE, Keystone EC, So AK, Braun J, Breedveld FC, Burmester GR et al. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2012. *Ann Rheum Dis* 2013; 72 Suppl 2:ii2-34.
- (163) Singh JA, Furst DE, Bharat A, Curtis JR, Kavanaugh AF, Kremer JM et al. 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken )* 2012; 64(5):625-639.
- (164) Winthrop KL, Weinblatt ME, Daley CL. You can't always get what you want, but if you try sometimes (with two tests--TST and IGRA--for tuberculosis) you get what you need. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(11):1757-1760.
- (165) Vassilopoulos D, Stamoulis N, Hadziyannis E, Archimandritis AJ. Usefulness of enzyme-linked immunospot assay (Elispot) compared to tuberculin skin testing for latent tuberculosis screening in rheumatic patients scheduled for anti-tumor necrosis factor treatment. *J Rheumatol* 2008; 35(7):1271-1276.
- (166) Vassilopoulos D, Tsirikla S, Hatzara C, Podia V, Kandili A, Stamoulis N et al. Comparison of two gamma interferon release assays and tuberculin skin testing for tuberculosis screening in a cohort of patients with rheumatic diseases starting anti-tumor necrosis factor therapy. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18(12):2102-2108.
- (167) Ayub A, Yale S, Reed K, Nasser R, Gilbert S. Testing for Latent Tuberculosis . *Clinical Medicine & Research* 2004; 2(3):191-194.
- (168) oxfordimmunotec. [www.oxfordimmunotec.com](http://www.oxfordimmunotec.com) [ 2018
- (169) Mazurek M, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. 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.



- (170) Sanofi Pasteur Limited HCHPaFBPHAOc. Risk of serious allergic reactions following Tubersol [tuberculin purified protein derivative (Mantoux)] administration . Health Canada . 2005.

Ref Type: Generic

- (171) Kim Y, Dawew-Higgs E, Zagarella S. Foreign body reaction involving a Mantoux test site. *Australas J Dermatol* 2005; 46:169-171.
- (172) Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159(1):15-21.
- (173) Zyl-Smit RN, Pai M, Peprah K, Meldau R, Kieck J, Juritz J 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(1):49-58.
- (174) Daley CL, Reves RR, Beard MA, Boyle J, Clark RB, Beebe JL et al. A summary of meeting proceedings on addressing variability around the cut point in serial interferon-gamma release assay testing. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34(6):625-630.
- (175) Raval A, Akhavan-Toyserkani G, Brinker A, Avigan M. Brief communication: characteristics of spontaneous cases of tuberculosis associated with infliximab. *Ann Intern Med* 2007; 147(10):699-702.
- (176) Westhovens R, Yocum D, Han J, et al. The safety of infliximab, combined with background treatments, among patients with rheumatoid arthritis and various comorbidities: a large, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1075-1086.
- (177) Hsia EC, Cush JJ, Matteson EL, et al. Comprehensive tuberculosis screening program in patients with inflammatory arthritides treated with golimumab, a human anti-tumor necrosis factor antibody, in Phase III clinical trials. *Arthritis Care Res* 2013; 65:309-313.
- (178) Chen DY, Shen GH, Chen YM, et al. Biphasic emergence of active tuberculosis in rheumatoid arthritis patients receiving TNFalpha inhibitors: the utility of IFNgamma assay. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:231-237.
- (179) Chen DY, Shen GH, Hsieh TY, Hsieh CW, Lan JL. Effectiveness of the combination of a whole-blood interferon-gamma assay and the tuberculin skin test in detecting latent tuberculosis infection in rheumatoid arthritis patients receiving adalimumab therapy. *Arthritis Rheum* 2008; 59(6):800-806.
- (180) Park JH, Seo GY, Lee JS, Kim TH, Yoo DH. Positive conversion of tuberculin skin test and performance of interferon release assay to detect hidden tuberculosis infection during anti-tumor necrosis factor agent trial. *J Rheumatol* 2009; 36(10):2158-2163.
- (181) Garcovich S, Ruggeri A, D'Agostino M, Ardito F, De SC, Delogu G et al. Clinical applicability of Quantiferon-TB-Gold testing in psoriasis patients during long-term anti-TNF-alpha treatment: a prospective, observational study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26(12):1572-1576.

- (182) Hatemi G, Melikoglu M, Ozbakir F, Tascilar K, Yazici H. Quantiferon-TB Gold in tube assay for the screening of tuberculosis before and during treatment with tumor necrosis factor alpha antagonists. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(3):R147.
- (183) Scrivo R, Sauzullo I, Mengoni F, Priori R, Coppola M, Iaiani G et al. Mycobacterial interferon-gamma release variations during longterm treatment with tumor necrosis factor blockers: lack of correlation with clinical outcome. *J Rheumatol* 2013; 40(2):157-165.
- (184) Papay P, Primas C, Eser A, Novacek G, Winkler S, Frantal S et al. Retesting for latent tuberculosis in patients with inflammatory bowel disease treated with TNF-alpha inhibitors. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36(9):858-865.
- (185) Scrivo R, Sauzullo I, Mengoni F, Iaiani G, Vestri AR, Priori R et al. Serial interferon-gamma release assays for screening and monitoring of tuberculosis infection during treatment with biologic agents. *Clin Rheumatol* 2012; 31(11):1567-1575.
- (186) He D, Bai F, Zhang S, Jiang T, Shen J, Zhu Q et al. High incidence of tuberculosis infection in rheumatic diseases and impact for chemoprophylactic prevention of tuberculosis activation during biologics therapy. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20(6):842-847.
- (187) Ringshausen FC, Schablon A, Nienhaus A. Interferon-gamma release assays for the tuberculosis serial testing of health care workers: a systematic review. *J Occup Med Toxicol* 2012; 7(1):6.
- (188) Cuomo G, D'Abrasca V, Iacono D, Pantano I. The conversion rate of tuberculosis screening tests during biological therapies in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2017; 3(2):457-461.
- (189) van Zyl-Smit RN, Zwerling A, Dheda K, Pai M. Within-subject variability of interferon-g assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. *PLoS One* 2009; 4(12):e8517.
- (190) Richeldi L, Ewer K, Losi M, Roversi P, Fabbri LM, Lalvani A. Repeated tuberculin testing does not induce false positive ELISPOT results. *Thorax* 2006; 61(2):180.
- (191) Winthrop KL, Iseman M. Bedfellows: mycobacteria and rheumatoid arthritis in the era of biologic therapy. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(9):524-531.
- (192) Edwards A, Gao Y, Allan RN, Ball D, de GH, Coelho T et al. Corticosteroids and infliximab impair the performance of interferon-gamma release assays used for diagnosis of latent tuberculosis. *Thorax* 2017; 72(10):946-949.
- (193) Slater M, Parsonnet J, Banaei N. Investigation of false-positive results given by the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3105-3107.
- (194) Herrera V, Perry S, Parsonnet J, Banaei N. Clinical Application and Limitations of Interferon- $\gamma$  Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection. *Clin Infect Dis* 2011; 52(8):1031-1037.

- (195) Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3061-3064.
- (196) Shanaube K, De Haas P, Schaap A, Moyo M, Kosloff B, Devendra A et al. Intra-assay reliability and robustness of QuantiFERON(R)-TB Gold In-Tube test in Zambia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:828-833.
- (197) Gaur R, Pai M, Banaei N. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *J Clin Microbiol* 2013; 51:3521-3526.
- (198) Metcalfe JZ, Cattamanchi A, McCulloch CE, Lew JD, Ha NP, Graviss EA. Test variability of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:206-211.
- (199) Whitworth WC, Hamilton LR, Goodwin DJ, Barrera C, West KB, Racster L et al. Within-subject interlaboratory variability of QuantiFERON-TB Gold In-Tube tests. *PLoS One* 2012; 7:e43790. *PLoS One* 2012; 7:e43790.
- (200) Franken WP, Thijsen S, Wolterbeek R, Bouwman JJ, el Bannoudi H, Kik SV et al. Variation in T-SPOT.TB spot interpretation between independent observers from different laboratories. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16(10):1439-1442.
- (201) Yi L, Sasaki Y, Nagai H, Ishikawa S, Takamori M, Sakashita K et al. Evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus for Detection of Mycobacterium tuberculosis infection in Japan. *Sci Rep* 2016;30617.
- (202) Moon HW, Gaur RL, Tien SS, Spangler M, Pai M, Banaei N. Evaluation of QuantiFERON-TB Gold-Plus in Health Care Workers in a Low-Incidence Setting. *J Clin Microbiol* 2017; 55(6):1650-1657.

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- 1) ΕΙΚΟΝΑ 1: Ενδοκυττάριο μονοπάτι του TNFR1
- 2) ΕΙΚΟΝΑ 2 : Ο ρόλος του TNFα στην κυτταρική ανοσία κατά τη λοίμωξη από το *M.tuberculosis*.
- 3) ΕΙΚΟΝΑ 3: Απεικόνιση των anti-TNF παραγόντων
- 4) ΕΙΚΟΝΑ 4: Αλληλεπιδράσεις με το infliximab και το etanercept.
- 5) ΕΙΚΟΝΑ 5: Αθροιστική αναλογία των περιπτώσεων φυματίωσης σε ασθενείς υπό αγωγή με anti-TNFα σε σχέση με τη διάρκεια της αγωγής (US Food and Drug Administration)
- 6) ΕΙΚΟΝΑ 6: Διαγνωστικός αλγόριθμος της φυματίωσης σε ασθενείς υπό anti-TNFα θεραπεία
- 7) ΕΙΚΟΝΑ 7: *M.tuberculosis* σε φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
- 8) ΕΙΚΟΝΑ 8: Χρώση του *M.tuberculosis* με Ziehl-Nilsen
- 9) ΕΙΚΟΝΑ 9: Μετάδοση της φυματίωσης
- 10) ΕΙΚΟΝΑ 10: Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών του κοκκιώματος
- 11) ΕΙΚΟΝΑ 11: Τα τέσσερα διακριτά στάδια της παθογένεσης της φυματίωσης
- 12) ΕΙΚΟΝΑ 12: Η φυσική εξέλιξη των των γεγονότων και το αποτέλεσμα σε ανοσοεπαρκή ασθενή μετά την έκθεση σε πυρήνες σταγονιδίων με μυκοβακτηρίδια από ασθενή με TB και επίχρισμα σιέλου
- 13) ΕΙΚΟΝΑ 13: Βασικές αρχές της T-SPOT.TB.
- 14) ΕΙΚΟΝΑ 14: Βασικές αρχές της Quantiferon
- 15) ΕΙΚΟΝΑ 15: Διαγνωστικός αλγόριθμος για LTBI σύμφωνα με τις οδηγίες του ACR 2015
- 16) Εικόνα 16 : Κάτοψη επωαστικής πλάκας
- 17) ΕΙΚΟΝΑ 17: Η ανοσολογική βάση των IGRAs
- 18) ΕΙΚΟΝΑ 18: Διάγραμμα ροής όπου απεικονίζονται ο έλεγχος για LTBI και η κατανομή των 247 ασθενών κατά τη διάρκεια της μελέτης (Οκτώβριος 2009-Δεκέμβριος 2013)
- 19) ΕΙΚΟΝΑ 19: Επίπεδα INF-γ

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- 1) ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Οι βασικές διαφορές των anti-TNFα παραγόντων
- 2) ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Οι βασικές διαφορές μεταξύ λανθάνουσας και ενεργού φυματίωσης
- 3) ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Ευαισθησία της TST όταν η σκληρία >0mm
- 4) ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Διαφορές μεταξύ των μεθόδων για τη διάγνωση της λανθάνουσας φυματίωσης
- 5) ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση ενεργού φυματίωσης.
- 6) ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Ερμηνεία αποτελεσμάτων της δοκιμασίας T-SPOT.TB
- 7) ΠΙΝΑΚΑΣ 7; Ερμηνεία αποτελεσμάτων τηςδοκιμασίας QFT-GIT
- 8) ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών (n=70) και θετικοποίησαν μία τουλάχιστον δοκιμασία ελέγχου (n=20) έναντι εκείνων που δεν θετικοποίησαν (n=50)
- 9) ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των ασθενών που εμφάνισαν θετικά αποτελέσματα σε μία τουλάχιστον δοκιμασία (IGRA .ή TST) κατά τη διάρκεια του 1 έτους αγωγής με anti-TNFα. Επίσης, παρατίθενται τα ατομικά αποτελέσματα των TST, T-SPOT.TB, QFT-GIT
- 10) ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Στατιστική ανάλυση