

Tüberküloz Enfeksiyonunda Yeni Tanı Yöntemleri

New Diagnostic Assays in Tuberculosis Infection

Ahmet Soysal, Mustafa Bakır

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı,
Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Özet

Dünya nüfusunun 1/3'ünün *M. tuberculosis* ile enfekte olduğu düşünülmektedir. Tüberküloz enfeksiyonu tanısında yıllardır kullanılan tek test tüberkülin deri testidir (TDT). Son yıllarda mikobakterilerin genomik yapısının belirlenmesi ile geliştirilen interferon- γ (IFN- γ) tabanlı testler tüberküloz enfeksiyonu tanısında daha güvenilir sonuçlar vermektedir. *M. tuberculosis* kompleksine özgül antijenler ile T hücrelerinin uyarılması sonucu oluşan özgül IFN- γ yanıtının belirlenmesi ilkesine dayanan bu testlerin iki tipi mevcuttur. Tüberküloza özgül aynı iki antijeni early secreted antigenic target-6kD (ESAT-6) ve culture filtrate protein 10kD (CFP-10) kullanmasına rağmen bu iki testin çalışma ilkeleri farklıdır. Quantiferon-TB Gold testi (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) tam kan kullanılarak uyarılan T hücrelerinin salgılamış olduğu özgül IFN- γ yanıtının serumda ELIZA yöntemi ile belirlenmesi ilkesine dayanırken, T-SPOT.TB testi (Oxford Immunotec, Oxford, UK) ficol sentrifüj yöntemi ile ayrıştırılan periferik mononükleer hücrelerin uyarılması sonucunda oluşan özgül IFN- γ yanıtının ELISpot yöntemi ile belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. BCG aşılması ve çevresel mikobakterilere maruziyet her iki testte yalancı pozitifliğe neden olmazlar ve TDT'nin yalancı negatif olduğu bir çok durumda bu testler daha güvenilir sonuçlar vermektedir. IFN- γ tabanlı bu testlerin gelecekte tüberküloz enfeksiyonu tanısında daha yaygın olarak kullanılacağı kanatındeyiz. (*Çocuk Enf Derg* 2007; 1: 151-7)

Anahtar kelimeler: Tüberküloz enfeksiyonu, tüberkülin deri testi, IFN- γ tabanlı testler, Quantiferon-TB Gold, T-SPOT.TB

Summary

M. tuberculosis is thought to be infected to 1/3 of the world's population. Routine diagnosis of *M. tuberculosis* infection is based on the century-old tuberculin skin test (TST), which has several drawbacks. Prior BCG vaccination and exposure to environmental mycobacteria may cause false positive reaction meanwhile in many clinical conditions TST may give false negative reaction. Recently alternatives have emerged in the form of novel interferon- γ (IFN- γ) assays. New generation tests use antigens specific to *M. tuberculosis* complex, such as early secreted antigenic target-6kD (ESAT-6) and culture filtrate protein 10kD (CFP-10). Two versions of these immunoassays are commercially available, the QuantiFERON-TB Gold assay (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia), and the T-SPOT.TB assay (Oxford Immunotec, Oxford, UK). Although both quantify IFN- γ response to tuberculosis antigens, the methods underlying these assays are quite different. QuantiFERON-TB Gold measures IFN- γ from supernatant in response to ESAT-6 and CFP-10. T-SPOT.TB is the ex vivo enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay which enumerates the IFN- γ secreting T-cells specific for the same antigens. Both assays are highly specific for tuberculosis infection and therefore, unlike, TST, are not confounded by previous BCG vaccination or exposure to environmental mycobacteria moreover, both assays are thought to be well operated in many clinical conditions where TST gives false negative result. We believe that IFN- γ based assays will be routinely used in diagnosis of tuberculosis infection in very near future. (*J Pediatr Inf* 2007; 1: 151-7)

Key words: Tuberculosis infection, tuberculin skin test, IFN- γ based assays, QuantiFERON-TB Gold, T-SPOT.TB

Yazışma Adresi

Correspondence Address

Dr. Ahmet Soysal
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi,
Çocuk Sağlığı ve
Hastalıkları Anabilim Dalı,
Çocuk Enfeksiyon
Hastalıkları Bilim Dalı,
Tophanelioğlu Cad.
Altunizade, İstanbul, Türkiye
Tel.: +90 216 327 37 57
E-posta:
bakirm@superonline.com

Tüberküloz (TB) HIV/AIDS'den sonra infeksiyöz hastalıklar içinde dünyada ölüme neden olan ikinci en sık nedendir (1). *M. tuberculosis* dünya nüfusunun 1/3'ünü infekte etmiştir ve 1996 yılında 6 milyondan fazla TB olgusu tespit edilmiştir. İki bin yılı içinde 8.3 milyon yeni tüberküloz vakası görülmüş ve bunların 884,019'unu çocuklar oluşturmuştur (2). Tüberküloz infeksiyonu tanısında yıllardır kullanılan tek test tüberkülin deri testidir (TDT). Bu test bir çok durumda yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlar verdiği için tanısal değeri sınırlıdır. Bu yüzden son yıllarda tüberküloz basili genomunun belirlenmesinden sonra yani tanısal testler geliştirilmeye başlamıştır.

***M. tuberculosis*'e Özgün Antijenler**

Uzun zamandan beri *M. tuberculosis*'e özgün antijenlerin saptanmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. *M. tuberculosis* kompleksine ait özgün antijen ilk kez Li ve arkadaşları (3) tarafından gösterilen 24 kDa ağırlığındaki MPB64 (MPT64) antijeni olup *M. bovis* ve *M. tuberculosis* kültür filtratlarında gösterilmiş fakat BCG örneklerinde gösterilememiştir. Bu gözlem daha sonraları polimerik zincir reaksiyonu (PZR) hibridizasyon yöntemiyle MPT64'ü kodlayan genin bulunmasını sağlamış ve bu genin bazı BCG kökenlerinde olmadığı saptanmıştır. Son yıllarda daha düşük moleküler ağırlıklı antijen olan ESAT-6 (early secreted antigen target, 6 kDa) *M. tuberculosis* kültür filtratlarından izole edilmiştir (4-5). Bu antijeni kodlayan genin *M. tuberculosis* kompleksinde bulunduğu, BCG suşlarında bulunmadığı, buna karşılık *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai* ve *M. flavescens* dışında diğer mikobakteri türlerinde bulunmadığı gösterilmiştir (6-7). Bu çalışmaların devamında ESAT-6 geninin promotor bölgesi belirlenmiş ve bir başka salgılanan antijenin (culture-filtrate protein 10 kDa, CFP-10) aynı gen ile kodlandığı tespit edilmiştir. Bu geni taşıyan diğer TDM türleri içinde sadece *M. kansasii*'nin nadiren tüberküloz benzeri hastalığa neden olduğu saptanmıştır. Danimarka'da yapılan bir çalışmada NTM ile infekte olan hastalardan elde edilen izolatların sadece %0.5'inde *M. kansasii* bulunmuştur (8). İn vitro pasajlar sırasında BCG suşunda bazı bölgelerin delesiya uğradığı gözlenmiştir. Bu bölgeler "regions of differences" (RD) RD-1, RD-2, ve RD-3 olarak adlandırılmış, ESAT-6, CFP-10 ve MPT64 (yeni antijenler eklenmeye devam etmektedir) gibi antijenlerin delesiya uğrayan bölgelerce kodlandığı gözlenmiştir (9). Tablo 1'de tüberküloz antijenleri ve bunların diğer mikobakteri türlerindeki varlıkları sunulmuştur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda BCG suşunda delesiya uğradığı bilinen 8'den fazla bölge saptanmıştır. Bu bölgeler 90'dan fazla ORF (open reading frames) içermektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda MPT64 antijeni için farklı sonuçlara ulaşılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu antijenin orta derecede lenfosit yanıtına yol açtığı ve TB hastalarında düşük oranda yanıt alındığı gözlenmiştir. PPD'ye reaktif tüberküloz hastalarının sadece %6'sında MPT64'e karşı gecikmiş

tip aşırı duyarlılık yanıtı saptanırken ortak antijen Ag85B (MPT59)'e karşı %50 yanıt bildirilmiştir (10). Bunun yanında yüksek doz MPT64 patch testinin hasta ile sağlıklı birey ayırımını %100 özgüllük ve %98.1 duyarlılık ile yapabildiği bildirilmiştir (11).

Tüberküloz İnfeksiyonunda Kullanılan Yeni Tanı Yöntemleri

Son yıllarda gerek immünoloji gerekse mikrobiyal genetik bilimlerinde kaydedilen gelişmeler tüberküloz infeksiyonu tanısında yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. BCG suşlarında ve tüberküloz dışı mikobakterilerin çoğunda bulunmayan, bu nedenle *M. tuberculosis*'e özgün sayılan RD1 geni ürünleri olan ESAT-6 ve CFP-10, spesifik T hücrelerinin belirlenmesinde TB tanısında test edilmiştir. Bu testler interferon-gamma (IFN- γ) tabanlı testler olup, daha önceden tüberküloza özgül antijenler ile duyarlaşmış T hücrelerinin salgılamış olduğu IFN- γ yanıtının belirlenmesi ilkesi ile çalışmaktadır. Yüksek düzeyde IFN- γ üretimi tüberküloz infeksiyonu göstergesi olarak kabul edilmiştir. Antijene özgü T hücrelerinin TB tanısında kullanılmasını esas alan iki ticari test kiti mevcuttur. Bu testler Quantiferon-TB (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) diğeri ise T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK) testleridir. Quantiferon-TB testinin iki nesli mevcuttur.

Quantiferon-TB test

İlk nesil Quantiferon-TB testi, (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) *M. tuberculosis*'e karşı duyarlaşmış lenfositlerden salgılanan IFN- γ 'nın belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. Hastadan alınan tam kan örneği PPD ve kontrol antijenler ile 16-24 saat inkübe edilir. Eğer kişi daha önce testte kullanılan antijenler ile karşılaşmışsa mononükleer hücreler IFN- γ salgılar. Süpernatantta daha sonra ELISA yöntemiyle IFN- γ varlığı ve miktarı belirlenir. TDT ile karşılaştırıldığında okuyucu veya uygulayıcıya bağlı hatalar söz konusu değildir. İnterferona dayalı testler içinde FDA (Amerikan gıda ilaç dairesi) onayını ilk alan testtir. CDC (Centers for Disease Control and Prevention; A.B.D. hastalık kontrol merkezi) tarafından yapılan çok merkezli çalışmada Quantiferon ile TDT arasında orta derecede uyum saptanmıştır. Bu testlerin kullanılmasında bazı kısıtlamalar söz konusudur. Daha önceden BCG aşısı yapılmış olması, tüberküloz dışı mikobakteriler ile karşılaşılması ve önceden TDT pozitif olması testin yalancı pozitifliğine neden olur.

Quantiferon-TB Gold testi (QFT-Gold)

İkinci nesil Quantiferon-TB testi olup antijen olarak PPD yerine ESAT-6 ve CFP10 antijenini kullanmaktadır. Bu testte tüberküloza özgü antijenlere karşı oluşan IFN- γ yanıtının in vitro belirlenmesi esastır. İki basamaklı bir testtir. İlk olarak alikotlanmış heparinize tam kan ESAT-6, CFP-10, mi-

tojen veya negatif kontrol antijenler ile inkübe edilir. 16-24 saat inkübasyon döneminden sonra serum ayrıştırılır ve süpernatantta ELISA yöntemi ile IFN- γ düzeyi belirlenir. Test sonuçları internasyonal ünite olarak verilir. Mitojen ile uyandırılan plazma örneği test edilen her bireyde pozitif kontrol olarak alınır. QFT-Gold testi ile Japonya'da yapılan bir çalışmada, TB teması olmayan BCG aşı 216 olguda PPD ile %98 uyumlu olduğu görülmüştür (12). Çalışmanın yapılmış olduğu toplumda epidemiyolojik olarak *M. tuberculosis* infeksiyonu (MTBİ) oranı %2 olarak tahmin edilmiştir. MTBİ için altın standart bir testin olmaması nedeniyle QFT-Gold testinin duyarlılığının tam olarak belirlenmesi mümkün olmamaktadır. Aktif TB hastalarında ise elde *M. tuberculosis* kültür sonuçları bulunduğu için bu hasta grubunda testin duyarlılığı belirlenebilmektedir. TB şüphesi olan ve daha sonra kültür örneklerinde *M. tuberculosis* üretilen 118 hasta QFT-Gold ile test edilmiştir. Aktif TB hastalarında duyarlılığı %89 (105/118) olarak bulunmuştur. Bu grupta deri testi'nin duyarlılığı %66, QFT-Gold testinin duyarlılığı ise %82 olarak bulunmuştur (13).

Ravn ve arkadaşlarının (14) yapmış olduğu bir çalışmada bu testin duyarlılığını %85, özgüllüğünü ise %97 olarak bulmuştur. Yine bir başka çalışmada aktif TB hastalarında testin duyarlılığı %81 olarak bulunmuştur (15). Dewan ve arkadaşları (16) QFT-Gold testini tüberküloz infeksiyonu şüphesi olan 242 bireye uygulamışlar ve 37 hastada kültür pozitif tüberküloz hastalığı tespit etmişler. Bu hastaların birinde QFT-Gold testi "belirsiz" sonuç verirken geriye kalan 36 hastanın 23 (%65)'ünde pozitif QFT-Gold yanıtı saptamışlardır. Araştırmacılar kendi hasta grubunda test duyarlılığının %65 gibi düşük oranda olduğu için aktif hastalık ekartasyonunda bu testlerin kullanılmaması gerektiğini vurgulamışlardır. Ferrara ve arkadaşları (17) QFT-Gold testinin tüberküloz infeksiyonu tanısında hastanede rutin kullanımını inceledikleri bir çalışmada 8 aylık dönemde tüberküloz infeksiyonu şüphesi olan 318 hastada QFT-Gold testini kullanmışlardır. Test edilen 318 olgunun 68 (%21.4)'inde QFT-Gold testinin "belirsiz" sonuç verdiği görülmüş ve "belirsiz" sonucun immünosupresif tedavi alan hastalarda ve tüberkülin deri testi negatif olan hastalarda daha yüksek oranda görüldüğünü saptamışlardır. Bu çalışmada geçerli test sonucu elde edilen 205 hastada QFT-Gold testi ile tüberkülin deri testi arasındaki uyum %70.2 (k değeri 0.40) olarak bulunmuştur. Higucki ve arkadaşları (18) tüberkülozlu bir olgu ile teması olan lise öğrencilerinde tüberkülin deri testi ile QFT-Gold testinin kullanılmasını karşılaştırdıkları çalışmada 349 lise öğrencisi test edilmiş ve tüberkülin deri testi pozitif olan 88 hastanın sadece 4'ünde QFT-Gold testinin pozitif olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar profilaktik tedaviyi sadece QFT-Gold testi pozitif olan 4 hasta vermiş ve tüberkülin deri testi pozitif olup QFT-Gold testi negatif olan temaslı öğrencilere profilaktik tedavi vermemiştir. Bu olguların 3.5 yıllık izlem döneminde hiçbirinin aktif tüberküloz hastalığı geliştirmediği gözlenmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada temaslı incelemesinde tüberkülin de-

ri testi yerine QFT-Gold testinin kullanılması ya da pozitif deri testinin QFT-Gold testi ile onaylanması gerektiği fikrini öne sürmüşlerdir. Nakaoka ve arkadaşları (19) ise QFT-Gold testi ve tüberkülin deri testini yayma-pozitif ve yayma-negatif olan tüberküloz hastası ile teması olan ve sağlıklı 207 çocukta karşılaştırmışlardır. Yayma pozitif tüberküloz hastası ile teması olan 78 çocuğun 38 (%49)'ünde tüberkülin deri testi pozitif bulunurken QFT-Gold testi olguların 53 (%74)'ünde pozitif olarak bulunmuştur. Yayma-negatif tüberküloz hastası ile teması olan 83 çocuğun 13 (%16)'ünde deri testi pozitif bulunurken QFT-Gold testi 8 (%10)'ünde pozitif olarak bulunmuştur. Temas öyküsü olmayan 46 çocuğun 6 (%13)'sında deri testi pozitif olarak bulunurken QFT-Gold testi 4 (%10)'unda pozitif olarak bulunmuştur. Dogra ve arkadaşları (20) tüberküloz hastalığı şüphesi olan veya tüberküloz hastası ile teması olan 105 çocukta tüberkülin deri testi ile QFT-Gold testini hastalık prevalansının yüksek olduğu Hindistan'da karşılaştırmışlar. Tüberkülin

Tablo 1. Mikobakteri antijenlerinin farklı türlerde dağılımı

Test edilen türler	Antijenler		
	ESAT-6	CFP-10	MPT 64
Tüberküloz kompleks			
M. tuberculosis	+	+	+
M. africanum	+	+	+
M. bovis	+	+	+
BCG kökenleri			
Gothenburg	-	-	-
Moreau	-	-	+
Tice	-	-	+
Tokyo	-	-	+
Danish	-	-	-
Glaxo	-	-	-
Montreal	-	-	-
Pasteur	-	-	-
Tüberküloz dışı mikobakteriler			
M. abscessus	-	-	-
M. avium	-	-	-
M. branderi	-	-	-
M. celatum	-	-	-
M. chelonae	-	-	-
M. fortuitum	-	-	-
M. gordonii	-	-	-
M. intracellulare	-	-	-
M. kansasii	+	+	-
M. malmoense	-	-	-
M. marinum	+	+	-
M. oenavense	-	-	-
M. scrofulaceum	-	-	-
M. szulgai	+	+	-
M. terrae	-	-	-
M. vaccae	-	-	-
M. xenopi	-	-	-

deri testi ve QFT-Gold testi ile olgularda infeksiyon prevalansı benzer olarak tespit edilmiştir. 105 çocuğun 10 (%9.5)'inde deri testi pozitif olarak bulunurken QFT-Gold testi çocukların 11 (%10.5)'inde pozitif olarak bulunmuş. Her iki test arasındaki uyum BCG aşı skarı olmayan çocuklarda %100 olarak bulunurken aşı skarı olan çocuklarda %94 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada araştırmacılar infeksiyon prevalansının yüksek olduğu bir ülkede çocuklarda tüberkülin deri testi ile QFT-Gold testinin benzer sonuçlar verdiğini ve BCG aşılmasının her iki test duyarlılığı üzerine etki etmediğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada aktif tüberküloz hastalığı tanısı konulan çocuk sayısı çok az olduğu için testlerin duyarlılığı hakkında yorum yapılmamıştır. Diel ve arkadaşları (21) balgam yayması-pozitif 15 tüberküloz hastası ile teması olanlarda tüberkülin deri testi ile QFT-Gold testini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada 309 temaslı inceleme yapılmış, bunlardan 137 (%44)'sinde deri testi, 31 (%10)'inde ise QFT-Gold testi pozitif olarak bulunmuştur. Bu çalışmada tüberkülin cilt testi ile QFT-Gold testi arasındaki uyum düşük olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra her iki test arasındaki uyum aşısız grupta daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu çalışmada QFT-Gold testinin MTBİ tanısında deri testine göre daha özgül olduğu sonucuna varmışlardır. Taggart ve arkadaşlarının (22) 137 erişkinde yapmış oldukları bir çalışmada tüberkülin deri testi, birinci nesil Quantiferon-TB testi ve Quantiferon-TB Gold testini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada araştırmacılar BCG aşısı yapılmamış düşük risk grubundaki 81, BCG aşısı yapılmış muhtemel tüberküloz temas öyküsü olan 30 ve aşı yapılmamış, düşük risk taşıyan ve daha önce tüberkülin deri testi pozitif olduğu bilinen 26 erişkini dahil etmişlerdir. İlk grupta yer alan 81 olgunun üçünde (%3.7) tüberkülin deri testi, 9'unda (%11.1) ilk nesil Quantiferon testi pozitif bulunurken QFT-Gold testi hepsinde negatif bulunmuştur. Bu çalışmada QFT-Gold testinin tüberküloz infeksiyonu açısından düşük risk bulunan popülasyonda tüberkülin deri testi ve ilk nesil Quantiferon testinden daha özgül olduğu gösterilmiştir. Diel ve arkadaşlarının (23) yapmış olduğu bir çalışmada ise temaslı taramasında tüberkülin deri testi ile Quantiferon-Gold testi maliyet etkinlik açısından karşılaştırılmış, tüberkülin deri testi ile QFT-Gold testinin birlikte kullanılması halk sağlığı harcamalarında belirgin olarak azalma sağladığını tespit etmişlerdir. Mayıs 2005 tarihinde QFT-Gold testi Amerikan Gıda ve İlaç kurumundan (FDA) tüberküloz infeksiyonu tanısında kullanılmak üzere onay almıştır (24). FDA bu testi tüberküloz hastalığı veya latent tüberküloz infeksiyonu düşünülen durumlarda in-vitro tanısal test olarak kullanılmasına onay vermiştir. QFT-Gold testinin tüberküloz hastalığının gelişmesindeki pozitif veya negatif tanısal tahmin değeri belirlenebilmiş değildir. Bununla birlikte bu test tüberkülin deri testinde olduğu gibi latent infeksiyon ile aktif hastalık arasında ayırım yapamaz. Bu yüzden pozitif sonuç elde edildiğinde latent tüberküloz infeksiyonu tanısı konulabilmesi için klinik ve radyolojik olarak aktif hastalığın olmadığı gösterilmesi gerekmektedir. Benzer

diğer testlerde de olduğu gibi bu testin tanısal değeri incelemenin yapıldığı popülasyondaki tüberküloz hastalığı prevalansı ile ilişkilidir. Bu yüzden bu testin sonucu yorumlanırken epidemiyolojik, fiziksel ve diğer tanısal bulguların göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Negatif tüberkülin deri testi ve negatif QFT-Gold testi tüberküloz hastalığı belirti ve bulguları olan bireyde tüberküloz tanısını ekarte ettirmez. Bu testin performansı bağışıklık sisteminin baskılandığı veya bozulduğu AIDS hastalarında, immunosupressif tedavi alan hastalarda, yüksek doz steroid tedavisi alanlarda, anti-TNF-alfa tedavisi alanlarda, hematolojik veya diğer solid organ kanseri olanlarda, diabeti olanlarda, kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda detaylı olarak çalışılmamıştır. Tüm bu bahsedilen durumlarda tüberkülin deri testinin duyarlılığı düşmektedir. Bu durumlarda IFN- γ üretiminde de düşüklük olabileceği göz önüne alındığında tek başına negatif QFT-Gold testi tüberküloz infeksiyonunu ekarte ettirmez. QFT-Gold testinin temaslı incelemesinde kullanımına ait çok fazla sayıda yapılmış çalışma mevcut değildir ve çocuklarda özellikle 17 yaş altında bu testin performansına ait çalışma mevcut değildir. Özellikle infeksiyonun ilerleme riskinin yüksek olduğu 5 yaş altı çocuklarda, HIV pozitif bireylerde ve anti-TNF-alfa tedavisi alanlarda testin negatif olması infeksiyon tanısını ekarte ettirmez. Bu testin kendi içinde kısıtlamaları mevcuttur. Öncelikle bireylerden kan alınması ve bu kanın uygun laboratuvar ortamında deneyimli kişilerce çalışılması gerekmektedir. Kan alındıktan 12 saat içinde antijenlerle uyarılarak inkübe edilmelidir. 16-24 saatlik inkübasyondan sonra ayrılan plazma uygun şartlarda daha sonra çalışılmak üzere dondurularak saklanabilir. QFT-Gold testi tüberkülin deri testinin kullanıldığı her klinik durumda kullanılabilir. Temaslı taraması, sağlık çalışanlarında tüberküloz infeksiyonu açısından taraması, göçmenlerde tüberkülin infeksiyonunun aranması ve seri olarak tüberküloz infeksiyonunun araştırılmasında tüberkülin deri testinin yerine kullanılabilir Pozitif QFT-Gold testi tıpkı pozitif tüberkülin deri testi gibi değerlendirilmelidir. Bu hastalarda tüberküloz hastalığının belirti ve bulguları araştırılmalı ve en azından akciğer grafisi çekildikten sonra aktif hastalığın olmadığı kanıtlanmalı ve ondan sonra MTBİ tanısı konulmalı ve infeksiyon tedavisi önerilmelidir. QFT-Gold testi negatif olan sağlıklı erişkinlerin tüberküloz basilli ile infekte olma ihtimali düşüktür ve şikayeti olmayan bu bireylerde ileri tetkik yapılmasına gerek yoktur. Bunun yanında tüberküloz hastası ile teması olan ve QFT-Gold test sonucu negatif olan bireylerde tıpkı tüberkülin deri testinde olduğu gibi QFT-Gold testi 8-10 hafta sonra tekrarlanmalıdır. Bu pencere döneminde 5 yaşın altındaki çocuklarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde profilaktik tedavi önerilmelidir. Bunun yanında diğer epidemiyolojik veriler göz önüne alınarak pencere dönemi sonrasında tekrarlanan test negatif olarak gelmesine rağmen diğer temaslı bireylerde infeksiyon tespit edilirse koruyucu tedavinin tamamlanması düşünülmelidir. Belirsiz QFT-Gold sonucu tüberküloz infeksiyonu hakkında bilgi vermez. Test sonucu

belirsiz çıkan bireylerde takip süresi belirlenmiş değildir. Bu bireylerde test yeni alınan bir kan örneğinden tekrar edilebileceği gibi bu bireylere tüberkülin deri testi birlikte veya tek başına uygulanabilir. Tüberküloz infeksiyon riski yüksek olan bireylerde testin tekrar edilmesi veya deri testi uygulanması gereklidir. Düşük risk grubunda yer alan bireylerde "belirsiz" test sonucunun tekrar edilmesine gerek yoktur.

T-SPOT.TB Testi

Son yıllarda özgün mikobakteriyel antijenlerle uyarılan T hücrelerinin salgıladıkları IFN- γ yanıtlarının belirlenmesi ilkesi ile çalışan bazı deneysel tanı yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan ELISPOT testi, kişinin periferik mononükleer hücrelerinin invitro şartlarda bu antijenlerle uyarılıp daha sonra oluşan IFN- γ yanıtının çift sandviç ELISA yöntemi ile belirlenmesi ilkesine dayanmaktadır. T-SPOT.TB testi (Oxford Immunotec, İngiltere) ise RD1-ELISPOT testinin ticari adıdır.

T-SPOT.TB Testinin Yapılışı

Testin uygulanacağı hastadan 5-10 cc arasında periferik venöz kan ya heparinli enjektöre yada test ile birlikte sağlanan tüplere alınmalıdır. Alınan kan örneğinden daha sonra fikol-sentrifüj yöntemi ile periferik mononükleer hücreleri ayrıştırılır. Daha sonra bu hücreler tabanı anti-IFN- γ ile kaplı olan her bir T-SPOT.TB plak çukurcuğuna eklenir. T-SPOT.TB plaklarında ilk çukurcuk negatif kontrol, ikinci çukurcuk pozitif kontrol, üçüncü çukurcuk Panel A (ESAT-6 antijeni) ve dördüncü çukurcuk ise Panel B (CFP-10 antijeni) içindir. Negatif kontrol çukurcuğuna sadece hücre konulur ve üzerine herhangi bir antijen eklenmez, pozitif kontrol çukurcuğuna ise hücre konulur ve hücreler daha sonra genel bir T-hücre uyarıcısı olan fitohemaglutinin ile uyarılır, diğer iki antijen çukurcuklarına Panel A ve Panel B olarak çalışma kiti içinden çıkan antijen solüsyonları eklenir. Daha sonra T-SPOT.TB plağı 37oC in 5% CO2 içeren ortamda (korbondioksit etüvünde) bir gece süreyle (16-18 saat) inkübe edilir. Daha sonra çukurcukların zemininde oluşan spot (noktalar) gözle veya ELISPOT optik okuyucu (AID-GmbH, Strassberg,Germany) ile sayılır. T- SPOT.TB testinin değerlendirilmesi şu şekilde olmaktadır: testin geçerli sayılabilmesi için pozitif kontrol çukurcuğunda en az 20 noktanın olması ve negatif kontrol çukurcuğundaki nokta sayısının 10'dan az olması gerekmektedir. Eğer negatif kontrol çukurcuğunda 10'dan fazla noktacık mevcut ise bu ya spontan interferon salınımını yada ikincil bakteriyel kontaminasyonu göstermektedir. Teknik olarak yanlışlıkla negatif kontrol çukurcuğuna antijen veya fitohemaglutinin eklenmeside benzer durum ile sonuçlanabilir. Pozitif kontrol çukurcuğunda 20'den fazla noktanın olması yeterli T hücre yanıtının olduğunu gösterir. Her ne kadar testin kullanım kılavuzunda 20'den az noktanın pozitif kontrol çukurcuğunda olması geçersiz test olarak tanımlansa da eğer antijen

ile uyarılan Panel A veya Panel B çukurcuklarında yeterli sayıda spot oluşumu var ise test geçerli olarak kabul edilebilir. Eğer çalışılmış olan test geçerli kriterleri sağlıyor ise testin pozitif veya negatif olarak yorumlanması şu şekilde olmaktadır. 1) negatif kontrol çukurcuğundaki spot sayısı 0-5 arasında ise her hangi bir antijen çukurcuğundaki spot sayısından negatif kontrol çukurcuğundaki spot sayısından 6 veya daha fazla ise test pozitif olarak kabul edilir. Eğer negatif kontrol çukurcuğundaki spot sayısı 6 ve daha fazla ise, herhangi bir antijen çukurcuğundaki spot sayısı negatif kontrol çukurcuğundaki spot sayısının iki katı olması halinde test pozitif olarak kabul edilir. Bu testin TDT ile karşılaştırıldığı ilk klinik çalışma Lalvani ve arkadaşları (25) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar kültür ile doğrulanmış aktif TB hastalarında ve tüberküloz dışı hastalığı olan bireylerde RD1-ELISPOT testi ile TDT'ni karşılaştırmışlardır. Aktif TB hastalığı olan bireylerde ELISPOT testinin duyarlılığı %96 bulunurken TDT'nin duyarlılığı %69 olarak saptanmıştır. ELISPOT testinin özgüllüğü bu çalışmada %92 olarak bulunmuştur. Diğer bir çalışmada Pathan ve arkadaşları (26) TB lenfadenitli 11 hastanın 10'unda, kültür-negatif 8 pulmoner TB'lu hastanın 7'sinde, kültür-pozitif 25 akciğer TB'lu hastanın 23'ünde ve kültür-pozitif akciğer TB'lu hasta ile ev içi teması olan TDT-pozitif sağlıklı 27 bireyin 23'ünde ESAT-6 ELISPOT yanıtlarını pozitif bulmuştur. Bunun yanında kontrol grubu olarak alınan ve TB temas öyküsü olmayan 28'i BCG aşıllı sağlıklı 32 bireyin hiçbirisinde ESAT-6 ELISPOT yanıtı pozitif bulunmamıştır. Ayrıca araştırmacılar TB tedavisi alan 12 hastanın izlemlerinde tedavi ile birlikte ESAT-6 spesifik T hücre sayısının zamanla azalma gösterdiğini de saptamışlardır. Munk ve arkadaşlarının (27) yapmış oldukları diğer bir çalışmada ekstrapulmoner ve pulmoner TB olguları ile sağlıklı bireyler RD1-ELISPOT yanıtları açısından değerlendirilmiştir. Bu çalışmada 56 sağlıklı birey ile 21'i pulmoner, 22'si ekstrapulmoner 43 kültür pozitif TB hastası incelenmiştir. Bu çalışmada ekstrapulmoner TB olgularında RD1-ELISPOT testinin duyarlılığı %76, pulmoner TB olgularında %77 bulunmuştur. Ex vivo PPD-ELISPOT yanıtları değerlendirildiğinde ekstrapulmoner tüberkülozda duyarlılığı %64, pulmoner TB olgularında %86 olarak saptanmıştır. RD1-ELISPOT testinin BCG aşıllı sağlıklı bireylerde özgüllüğü %94, ex vivo PPD testinin özgüllüğü %55 bulunmuştur. RD1-ELISPOT testi HIV-pozitif hastalarda da değerlendirilmiştir (28). Bu çalışmada incelenen HIV-negatif 11 TB'lu hastanın 11'inde (%100), HIV-pozitif 39 TB'lu hastanın 35'inde (%90) RD1-ELISPOT yanıtı pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca HIV-negatif sağlıklı 54 bireyin 27'sinde (%69) RD1-ELISPOT yanıtı pozitif bulunurken, HIV-pozitif asemptomatik 21 bireyin 9'unda (%43) pozitif olarak bulunmuştur. Bu çalışmada araştırmacılar RD1-ELISPOT testinin HIV hastalarında yüksek duyarlılığa sahip olduğu kanısına varmışlardır. MTBİ tanısında kullanılan altın standart bir test bulunmadığı için RD1-ELISPOT testinin MTBİ tanısında duyarlı-

lık ve özgüllüğünün belirlenmesi mümkün değildir. Bununla birlikte tüberkülozlu bireye temas yoğunluğu ile MTBİ arasındaki ilişki, TDT ve RD1-ELISPOT testleri kullanılarak araştırılmış ve hangi testin temas derecesi ile daha yakından ilişkili olduğu incelenmiştir (29). Balgam-pozitif akciğer tüberkülozlu birey ile teması olan bireyler temas derecelerine göre gruplandırılmıştır. Sonuç olarak araştırmacılar RD1-ELISPOT testi ile temas derecesi arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu (odds oranı=9, %95 CI, 2.6-31.6 p=0.001) bunun yanında TDT'nin daha zayıf derecede ilişkili olduğunu (1.9, %95 CI 1.0-3.5, p=0.05), ELISPOT sonuçlarının BCG aşı durumundan etkilenmediğini fakat TDT pozitifliğinin BCG aşı grubta daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bir başka çalışmada temas yoğunluğu ile enfeksiyonun belirlenmesinde kullanılan testlerin başarısı bir okulda çıkan TB salgını sırasında araştırılmıştır (30). İngiltere'de 2001 yılında bir okulda kaviter TB'lu bir ortaokul öğrencisi ile teması olan 1128 öğrencinin 69'unda TB ve 254'ünde TDT ile MTBİ tespit edilmiş, incelenen 550 çocuğun 467'sinin (%87.3) BCG aşı grubta olduğu, 380'inin (%71.1) TDT-negatif, 155'inin (%29.9) TDT- pozitif olduğu gözlenmiştir. RD1-ELISPOT testi TDT ile karşılaştırıldığında indeks olguya yakınlık ve temas derecesi ilişkisini RD1-ELISPOT testinin daha iyi belirlediği bulunmuştur. Bu çalışmada TDT'nin BCG aşı grubta aşısızlara göre daha yüksek oranda pozitif olduğu bulunurken, ELISPOT testinin BCG aşılanmasından etkilenmediği saptanmıştır. Bir başka çalışmada Richeldi ve arkadaşları (31) çoğul-ilaç dirençli pulmoner tüberkülozlu birey ile hastanede kısa süreli teması olan hastalarda RD1-ELISPOT testinin TDT ve PPD-ELISPOT testine göre daha erken dönemde enfeksiyonu gösterdiğini saptamışlardır. Bir başka çalışmada Wrighton-Smiht ve arkadaşları (32) temaslı taramasında T-SPOT.TB testi ile tüberkülin deri testinin maliyet etkinlik analiz çalışmasını yapmışlar. Bu çalışmada 267 temaslı incelenmiş ve bunların 193'ünde (%72) tüberkülin deri testi pozitif olarak bulunurken sadece 74 (%27) temaslıda T-SPOT.TB testi pozitif olarak bulunmuştur. Tüberkülin deri testi pozitif olan 193 hastanın sadece 65'inde (%33) T-SPOT.TB testi pozitif olarak bulunmuştur. Bu çalışmada maliyet analizi yapıldığında pozitif deri testinin T-SPOT.TB testi ile doğrulanmasının maliyet etkin olduğunu göstermişlerdir. Soysal ve arkadaşlarının (33) yapmış olduğu diğer bir çalışmada İstanbul Anadolu yakasında tüberküloz temas öyküsü olmayan sağlıklı 209 çocukta tüberkülin deri testi ile T-SPOT.TB testi sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada çalışmaya alınan çocukların 50'sinde TCT 0 mm, 45'inde 10-14 mm, 95'inde 15-19 mm ve 19'unda 20 mm veya üzerinde bulunmuş. 209 olgunun 120'sinde (57%) TDT pozitif iken, 31'inde (15%) T-SPOT.TB testi pozitif olarak bulunmuştur. TDT pozitif olarak bulunan 117 olgunun sadece 25'inde (%24) T-SPOT.TB testi pozitif olarak bulunmuştur. TDT negatif olan olguların sadece üçünde (%3) T-SPOT.TB testi pozitif olarak saptanmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar temas öyküsü olmayan sağlıklı ve BCG aşı

çocuklarda tüberkülin deri testinin latent tüberküloz enfeksiyonu tanısında yüksek oranda yalancı pozitif sonuç verdiğini göstermişlerdir. RD1-ELISPOT testi BCG aşısının koruyuculuğunu değerlendirmek amacıyla da kullanılmıştır. Soysal ve arkadaşları (34) 414 balgam yayması-müspet erişkin aktif akciğer tüberkülozlu hasta ile son 6 aylık dönemde ev içi teması olan 979 çocukta yaptıkları temaslı incelemesi çalışmasında RD1-ELISPOT testine dayanarak BCG aşı skar varlığının tüberküloz enfeksiyonu olasılığını %24 oranında azalttığı ve ikinci aşının enfeksiyon için ek bir koruma sağlamadığını ilk kez göstermişlerdir.

QFT-Gold testi ile T-SPOT.TB testinin bire bir karşılaştırıldığı çok fazla sayıda çalışma mevcut değildir. Lee ve arkadaşları (35) QFT-Gold testi ile T-SPOT.TB testini 224 olguda karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada olguların 87'si aktif tüberküloz hastası ve geriye kalan 131 kişi ise sağlıklı bireylerden oluşmuş. Bu çalışmada T-SPOT.TB testinin duyarlılığı (%96.6) QFT-Gold (%70.1) testi ile karşılaştırıldığında daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 10 mm endürasyon çapı pozitif kriter olarak kabul edildiğinde tüberkülin deri testinin duyarlılığı (%66.7) en düşük olarak bulunmuştur. QFT-Gold testinin özgüllüğü %91.6 olarak bulunurken T-SPOT.TB testinin özgüllüğü %84.7 olarak bulunmuştur. QFT-Gold testinin özgüllüğü daha yüksek olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmada tüberkülin deri testinin duyarlılığı %78.6 olarak en düşük seviyede bulunmuştur. Soysal ve arkadaşları (yayınlanmamış veri) kültür-pozitif tedavi almamış 100 erişkin pulmoner tüberküloz hastasında bu iki testi karşılaştırmıştır. Bu çalışmada tüberkülin deri testinin, QFT-Gold ve T-SPOT.TB testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %70, %78 ve %83.5 olarak bulunmuştur. Testlerin özgüllükleri ise sırasıyla %45, %89.4 ve %87.2 olarak bulunmuştur.

Yorum

Sonuç olarak yüz yıldır tüberküloz enfeksiyonu tanısında kullanılan tüberkülin deri testine alternatif bir test geliştirilmemişti. Son yıllarda mikobakteri türlerinin genomik yapısının belirlenmesinden sonra tüberküloza özgün antijenleri kullanarak daha özgül ve duyarlı testlerin geliştirilebileceği fikri ortaya atılmıştır. Bu amaçla geliştirilen ve tüberküloza özgü antijenler ile uyarılan T hücrelerinin salgılamış olduğu IFN- γ düzeyini belirleme ilkesi ile çalışan bu yeni testler tüberkülin deri testinin duyarlılığının ve özgüllüğünün düşük olduğu veya kullanılmadığı bir çok durumda kullanılabilirliğini yapılan çalışmalarda göstermiştir. Bunun yanında unutulmaması gereken bir nokta ise bu yeni geliştiren testler hakkında tüberkülin deri testinde olduğu kadar yeterli sayıda çalışma ve tecrübe mevcut değildir. Bu alanda yapılacak olan yeni çalışmalar ile bu testlerin kullanımının yaygınlaşacağı ve gelecekte tüberküloza özgül antijenlerin sayısının artması ile latent enfeksiyon ile yakın enfeksiyonu veya hastalık ile enfeksiyon ayırımını yapacak yeni tanı metodlarının geliştirilebileceği kanısındayız.

Kaynaklar

1. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, et al. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362:887-89.
2. Nelson LJ, Wells CD. Global epidemiology of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:636-647.
3. Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO et al. MPB64 gene in some substrains of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1993;61:1730-34.
4. Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, et al. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 1995;154:3359-72.
5. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:1710-17.
6. HADBoe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1996;64:16-22.
7. Pollock JM, Anderson P. The potential of the ESAT-6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *J Infect Dis* 1997;175:1251-54.
8. Non-tuberculosis mycobacteria. 1995-1996 EPINEWS 1997;Week 50, <http://www.ssi.dk/dk/epinyt/1997/uge50.html>.
9. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M bovis*. *J Bacteriol* 1996;178:1274-82.
10. Wilcke JT, Jensen BN, Ravn P, et al. Clinical evaluation of MPT-64 and MPT-59, two proteins secreted from *Mycobacterium tuberculosis*, for skin test reagents. *Tuber Lung Dis* 1996;77:250-56.
11. Nakamura RM, Velmonte MA, Kawajiri K, et al. MPB64 mycobacterial antigen; a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998;2:541-46.
12. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Specific detection of tuberculosis infection. An interferon- γ -based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:59-64.
13. Fietta A, Meloni F, Cascina A, et al. Comparison of a whole-blood interferon- γ assay and tuberculin skin testing in patients with active tuberculosis and individuals at high or low risk *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Infect Control* 2003;31:347-53.
14. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, et al. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:491-96.
15. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon- γ assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 2005;293:2756-61.
16. Dewan PK, Grinsdale J, Kawamura LM. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007;44:69-73.
17. Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:631-35.
18. Higuchi K, Harada N, Mori T, Sekiya Y. Use of QuantiFERON(R)-TB Gold to investigate tuberculosis contacts in a high school. *Respirology*. 2007;1:88-92.
19. Nakaoka H, Lawson L, Squire SB, et al. Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis* 2006;9:1383-1389.
20. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, et al. Comparison of a whole blood interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect*. 2006 May 27; [Epub ahead of print]
21. Diel R, Nienhaus A, Meywald-Walter K, et al. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res* 2006;7:77.
22. Taggart EW, Hill HR, Ruegner RG, et al. Evaluation of an in vitro assay for interferon gamma production in response to the *Mycobacterium tuberculosis*-synthesized peptide antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD skin test. *Am J Clin Pathol*. 2006;3:467-73.
23. Diel R, Nienhaus A, Lange C, Schaberg T. Cost-optimisation of screening for latent tuberculosis in close contacts. *Eur Respir J* 2006;1:35-44.
24. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep*. 2005 Dec 16;54(RR-15):49-55.
25. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:824-28.
26. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al. Direct ex vivo analysis of antigen specific IFN- γ secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: Associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001;167:5217-25.
27. Munk ME, Arend SM, Brock I, et al. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2001;183:175-76.
28. Chapman ALN, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS* 2002;16:2285-93.
29. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001;357:2017-21.
30. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis. *Lancet* 2003;361:1168-73.
31. Richeldi L, Ewer K, Losi M, et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:288-95.
32. Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection. *Eur Respir J*. 2006;28:45-50.
33. Soysal A, Türel Ö, Toprak D, Serpil E, ve ark. Tüberküloz temas öyküsü olmayan sağlıklı çocuklarda latent tüberküloz infeksiyonu tanısının RD1-ELISPOT yöntemi ile doğrulanması. 50. Milli Pediatri Kongresi Program Kitabı, 8-12 Kasım 2006, Antalya, Türkiye
34. Soysal A, Millington KA, Bakır M, et al. Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study. *Lancet* 2005;366:1443-1451.
35. Lee JY, Choi HJ, Park IN, et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J*. 2006 ;28:24-30.