

İMMUNSÜPRESİF HASTALARDA LATENT TÜBERKÜLOZ ENFEKSİYONU TANISINDA TÜBERKÜLİN DERİ TESTİ İLE QUANTİFERON-TB GIT TESTİNİN ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Figen Deveci,¹ Dr. Nevin İlhan,² Dr. Teyfik Turgut,¹ Dr. Funda Yıldırım,¹ Dr. Mehmet Hamdi Muz¹

¹ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD, Elazığ

² Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD, Elazığ

ÖZET

Amaç: İmmünesupresif (IS) olgularda latent tüberkülozun (LTB) tanısında Tüberkülin deri testi (TDT) ile Quantiferon TB-Gold-In tube (QFT-GIT) testinin tanısal değerinin karşılaştırılması.

Materyal ve Metod: Çalışmaya IS olan 50 olgu ile IS olmayan 23 LTB'li olgu alındı. Olguların tümünde beyaz küre, lenfosit, albumin düzeyleri ve QFT-GIT testi düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: TDT, IS olguların 38'inde (%74,5) pozitifti. Ortalama QFT-GIT düzeyleri IS olmayan-LTB'li olgular ($4,66 \pm 4,56$ IU/mL) ile IS olup TDT pozitif olan ($n=38$) olgular karşılaştırıldığında ($0,92 \pm 1,50$ IU/mL) IS olmayan LTB'li olgularda istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0,002$). QFT-GIT testi pozitiflik oranı açısından IS olmayan-LTB olgu grubuyla tüm IS olgu

grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($X^2=3,667$, $p=0,055$). Sadece IS olgular değerlendirildiğinde IS olup TDT pozitif ve TDT negatif olgular arasında QFT-GIT testi pozitiflik oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($X^2=2,360$, $p=0,125$). Ek olarak bu grupta QFT-GIT testinin LTB'nin saptanmasındaki sensitivitesi %47, spesifitesi ise %77 idi. Kappa (κ) istatistiğine göre bu iki test arasındaki uyum düşüktü (%54,9, $\kappa: 0,170$). Tüm olgular değerlendirildiğinde QFT-GIT testi ile TDT arasında pozitif korelasyon ($r=0,453$; $p=0,000$) saptandı.

Sonuç: IS olgularda ülkemiz şartlarında QFT-GIT testinin TDT'ye göre çok da üstün olmadığı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İmmünesupresif hasta, latent tüberküloz, interferon- γ salınım testi, tüberkülin deri testi Nobel Med 2012; 8(3): 44-51

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF QUANTIFERON TB-GOLD IN TUBE TEST WITH TUBERCULIN SKIN TEST FOR THE DIAGNOSIS OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION IN IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS

ABSTRACT

Objective: To compare the diagnostic value of the tuberculin skin test (TST) and the Quantiferon TB-Gold-In tube (QFT-GIT) test for diagnosis of latent tuberculosis (LTB) in immunosuppressive (IS) patients.

Material and Method: 50 IS patients and 23 non-IS patients with LTB were included into the study. White blood cells, lymphocyte, albumin levels and QFT-GIT levels were measured.

Results: TST was positive in 38 (74.5%) of IS patients. Mean QFT-GIT levels was statistically higher in non-IS patients with LTB (4.66±4.56 IU/mL) than IS patients

with TST positive (0.92±1.50 IU/mL) ($p=0.002$). There was no significantly difference for the positive response rate of QFT-GIT between non-IS patients with LTB and all IS patients ($X^2=3.667$, $p=0.055$). When evaluated only IS patients group, there was no significantly difference for the positive response rate of QFT-GIT between TST positive and negative subjects ($X^2=2.360$, $p=0.125$). In addition, sensitivities of QFT-GIT was 47% and specificities was 77% for diagnosis of LTB in this group. Accordingly, the kappa (κ) statistic for the agreement between the two tests was low (54.9%, $\kappa=0.170$). When evaluated all subjects, there was a positive correlation between QFT-GIT and TST ($r=0.453$; $p=0.000$).

Conclusion: We conclude that there was no notable difference between QFT-GIT test and TST particularly for our country.

Key Words: Immunosuppressive patients, latent tuberculosis, interferon- γ release assay, tuberculin skin test *Nobel Med 2012; 8(3): 44-51*

GİRİŞ

Latent tüberküloz (LTB) sessiz mikobakteri varlığı olarak tanımlanabilir.^{1,2} İmmünsupresif (IS) hastalarda LTB enfeksiyonunun aktif tüberküloza (TB) ilerleme riski genel popülasyona göre daha yüksektir. LTB enfeksiyonunun belirlenmesi ve tedavisi TB eliminasyon stratejisinin en önemli bileşenidir.³

Tüberkülin deri testi (TDT) bazı sınırlılıklara rağmen LTB enfeksiyonunun saptanmasında geçerli bir metodur. Bu test sonuçlarının değerlendirilmesi ikinci bir hasta viziti gerektirir. Bacillus-Calmette-Guerin (BCG) aşılması ve çevresel mikobakteri maruziyeti nedeniyle yanlış pozitifliğe yol açabildiğinden spesifitesi düşüktür.^{4,5} Kazanılmış immün yetersizlik sendromu (Acquired Immune Deficiency Syndrome=AIDS) ve diğer IS nedenlere bağlı olarak immün sistemi baskılanan bireylerde sensitivitesi de düşük olabilir.⁶

Patojen *M. tuberculosis complex* soyları tarafından spesifik olarak salınan "early secreted antigen target 6" (ESAT-6), "culture filtrate protein 10" (CFP-10), TB7.7 antijenleri gibi mikobakteriyel proteinlerin keşfi ile LTB'nin tanısında daha spesifik tanısal testler geliştirilmiştir.⁷ Son dönemlerde enzyme linked immunospot (ELISPOT) yöntemiyle bakılan T-SPOT-TB testi ve enzim immünoassay (ELISA) esasına dayanan Quantiferon TB testi (QFT-TB) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drugs Administration=FDA) tarafından onaylanmıştır. ELISA esasına dayanan testte ESAT-6, CFP-10 ve TB7.7 peptidleriyle in vitro sti-

mülasyon sonrası periferik kan CD4⁺T lenfositlerinden salınan antijen spesifik interferon-gama (INF- γ) düzeyleri ölçülürken ELISPOT yönteminde *M. tuberculosis* spesifik antijenik stimülasyon sonrası periferik kan mononükleer hücreleri arasında INF- γ üreten T lenfosit sayısı ölçülmektedir. İmmünsupresif olmayan kişilerde yapılan çalışmalarda INF- γ düzeylerinin ölçüldüğü bu testlerin TDT ile karşılaştırıldığında BCG veya çevresel mikobakterilerle çapraz reaksiyon vermediği ve *M. tuberculosis* maruziyeti ile iyi bir korelasyon gösterdiği saptanmıştır.^{5,8}

Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde TB insidansı 2005 yılında 100.000'de 26'dır.⁹ Enfeksiyon riski %0,1'den çok yüksek olması nedeniyle ülkemizde BCG aşısı tüm yeni doğanlarda rutin olarak uygulanmaktadır.

Çalışmamızda hastanemizde çeşitli kliniklerce takip edilen immün yetersizlikli olgularda LTB enfeksiyonlu olguların tanısında TDT ile Quantiferon TB-Gold-In tube (QFT-GIT) testinin tanısal değerinin karşılaştırması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmamız Fırat Üniversitesi Hastanesi Endokrinoloji, Nefroloji, Romatoloji ve Onkoloji kliniklerinde takip edilen IS olgular ve Elazığ Verem Savaşı Dispanserine çeşitli nedenlerle başvuran LTB'li olgularda yapıldı.

Çalışma grupları: Çalışma grupları aşağıdaki şekilde →

İMMÜNSÜPRESİF HASTALARDA
LATENT TÜBERKÜLOZ
ENFEKSİYONU TANISINDA
TÜBERKÜLİN DERİ TESTİ
İLE QUANTİFERON-TB GIT
TESTİNİN ETKİNLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

| Tablo 1: QFT-GIT testinin değerlendirilmesi | |
|---|-------|
| TB- Spesifik Antigen- Nil (IU/mL) | Sonuç |
| QFT-GIT pozitif | ≥0,35 |
| QFT-GIT negatif | <0,35 |

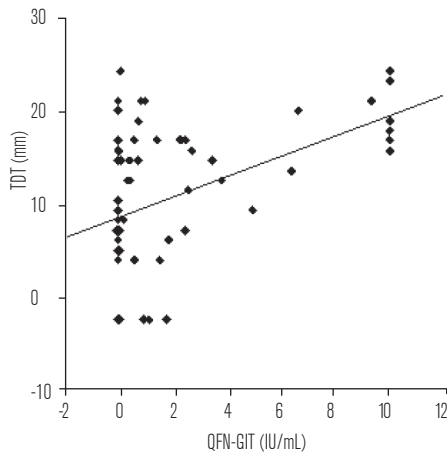
QFT-GIT: Quantiferon TB-Gold-In tube, TB: tüberküloz

| Tablo 2: IS ve LTB'li olgularda TDT pozitiflik oranları | | | |
|---|-------------------|-------------------|--------------|
| | TDT pozitif n (%) | TDT negatif n (%) | Toplam n (%) |
| IS olgu grubu | 38 (74,5) | 13 (25,4) | 51 (100) |
| IS olmayan-LTB olgu grubu | 23 (100) | 0 (0,0) | 23 (100) |

IS: Immünespresif, TDT: tüberkülin deri testi, LTB: latent tüberküloz

| Tablo 3: Gruplardaki QFT-GIT testi pozitiflik oranları | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|--------------|
| | QFT-GIT pozitif n (%) | QFT-GIT negatif n (%) | Toplam n (%) |
| IS olgu grubu | 21 (41,2) | 30 (58,8) | 51 (100) |
| IS olmayan-LTB olgu grubu | 15 (65,3) | 8 (34,7) | 23 (100) |

QFT-GIT: Quantiferon TB-Gold-In tube, IS: Immünespresif, LTB: latent tüberküloz



Şekil 1. QFT-GIT testi ile TDT arasındaki ilişki

oluşturuldu; IS olgu grubu (n=54): diabetes mellitus'u (DM) olan 17, kronik böbrek yetersizliği olan (KBY) 16, çeşitli nedenlerle (malign hastalık, bağ dokusu hastalığı) IS veya anti-tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) tedavisi alan 21 olgu.

IS olmayan 30 olgunun kontrol grubu olarak alınması planlandı. Çalışmaya alınan tüm olguların demografik, klinik, radyolojik verileri, geçirilmiş TB öyküsü, TB temas öyküsü ve daha önce yaptırılmış TDT öyküsü, BCG skar sayıları kaydedildi. Olguların tümüne beyaz küre (BK), lenfosit, albumin düzeyleri ve QFT-GIT testi için kan örnekleri alındıktan sonra TDT uygulandı. IS olmayan 30 olgudan TDT'si pozitif olan, aktif akciğer TB'si olmayan, fizik muayenesi normal olan 23 olgu IS olmayan-LTB'li olgu grubu olarak kabul edildi.

Çalışma için üniversitemiz Etik Kurulundan onay ve tüm olgulardan çalışma hakkında gerekli bilgilendirilmeden sonra onam alındı. Aktif TB'si olan olgular ve malnutrisyonu olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

TDT'nin uygulanması: Tüm olgulara ön kolun volar yüzüne 0,1 ml 5 IU PPD (BB-NCIPD Ltd, Sophia, Bulgaria) solüsyonu intradermal olarak (Mantoux Test) uygulandı ve 72 saat sonra endürasyonun transvers olarak çapı aynı kişi tarafından okundu. BCG pozitiflerde 15 mm ve üzerindeki, BCG'sizlerde 10 mm ve üzerindeki ve bağışıklığı baskılanmışlarda 5 mm ve üzerindeki endürasyon çapları pozitif olarak kabul edildi.¹⁰ TDT sonucu negatif olanlara en az 1 hafta sonra TDT tekrar yapılarak Booster etkisi değerlendirildi ve 2. sonuçlar değerlendirilmeye alındı.

Quantiferon-TB Gold In-Tube testinin uygulanması: Bu test için QuantiFERON-TB Gold (In-Tube Method) (Cellestis Limited, Australia) kiti ile, Nil kontrol tüpleri, TB spesifik antijen tüpleri (antijen olarak ESAT 6, CFP 10, TB7.7) ve QTF TB kan alma tüpleri (Mitogen Kontrol) kullanılarak kanlar alındı.

Çalışmaya katılan kişilerden her üç tüpe 1'er ml kan alınarak tüpler 8-10 kez ters çevrilerek karıştırıldı. Daha sonra tüpler 37°C'de etüvde 16-24 saat dik olarak inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler 2000-3000 RCF'de 15 dakika santrifüj edilerek plazmanın (jel tabakası ile) hücrelerden tamamen ayrılması sağlandı. Steril ependorf tüplerden ayrılan plazmalar çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı.

Konjugat dışında tüm ELISA solüsyon, standart, plak ve örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri beklenildi. Standart etiketinde belirtilen miktardaki distile su ile sulandırıldı ve sulandırılan standart ise prospektüste belirtildiği şekilde green diluent ile sulandırılarak 4 farklı IFN- γ konsantrasyonu elde edildi. "Conjugat", 0,3 ml distile su ile sulandırıldı. Prospektüste yer alan şemaya göre çalışma solüsyonu hazırlandı (Conjugat x 100 Kons + Green Dil). Taze hazırlanan "Conjugat" çalışma solüsyonundan kullanılan tüm ELISA kuyularına 50 μ l olacak şekilde pipetlenildi. "Conjugat" çalışma solüsyonu içeren mikropklarda belirlenen pozisyonlara 50 μ l plazma örnekleri ve 50 μ l standart solüsyonları pipetlendi. Pipetleme öncesinde örnek tüpleri karıştırılarak, plazma örneklerinin homojen hale gelmesi sağlandı her bir ELISA çalışmasında standart solüsyonları çift olarak çalışıldı. ELISA shaker ile mikropkları kuyular arasında bir kontaminasyon olmayacak şekilde 1 dk karıştırıldı, mikropkları üzeri kapatılarak gün ışığı görmeyecek şekilde oda sıcaklığında 120 dk inkübe edildi. "Wash Buffer" çalışma solüsyonu distile su ile sulandırılarak hazırlandı, otomatik ELISA yıkayıcı ile →

kuyular 400 µl yıkama solüsyonu ile 7-8 kez yıkandı. Her bir kuyuya 100 µl Enzim substrat solüsyonu pipetlendi. ELISA shaker ile mikropaklar kuyular arasında bir kontaminasyon olmayacak şekilde 1 dk karıştırıldı. "Plate"ın üzeri kapatılarak gün ışığı görmeyecek şekilde 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon ilk kuyuya substratın pipetlenmesi ile başlatıldı süre sonunda her bir kuyuya 50 µl "Stop" solüsyon pipetlendi. Stop solüsyonunun pipetlenmesinden sonra 5 dk içinde 450 nm ana dalga boyunda (620/650 nm referans filtreleri kullanılarak) mikropakların optik dansiteleri (OD) okutuldu. Sonuçlar excel'de bir tabloya girildi. Cellestis firması tarafından hazırlanan QFT-GIT Analysis yazılımı kullanılarak bulunan sayısal değerlerden kalibrasyon eğrisi ve sonuçların hesaplanması gerçekleştirildi. QFT-GIT testinin değerlendirilmesi Tablo 1'de gösterilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 12.0 bilgisayar programı kullanıldı. Ölçülebilir verilerin dağılımı ortalama±standart sapma ($X \pm SD$) olarak sayılabilir verilerin dağılımı ise yüzde (%) olarak tanımlandı. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Niceliksel verilerin gruplar arasında karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi ve anlamlılık saptanan parametrelerde grupların ikili karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve tanı tarama testleri (sensitivite, spesifite vb) kullanıldı. TDT ile QFT-GIT testi arasındaki uyumun belirlenmesi için Kappa (κ) istatistiği uygulandı. Parametreler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde Pearson korelasyon testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda 2 IS tedavi alan ve 1 KBY'li olgunun QFT-GIT testi sonucu mitojen uyarımı olmadığı için belirlenemediğinden (indeterminate) bu olguların sonuçları değerlendirmeye alınmadı ve istatistiksel analizler 74 olgu üzerinden yapıldı.

Çalışmaya ve istatistiksel analize dahil edilen IS'li 51 olgunun 25'i erkek (%49,02), 26'sı kadın (%50,98) olup yaş ortalaması $57,25 \pm 16,13$, IS olmayan-LTB'li 23 olgunun 10'u erkek (%43,48), 13'ü kadın (%56,52) olup yaş ortalaması $51,08 \pm 12,40$ 'dı. Gruplar arasında yaş ortalaması ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

TDT sonuçları IS olguların 38'inde (%74,5) (ort TDT= $12,31 \pm 4,84$ mm), IS olmayan-LTB enfeksiyonu olan bireylerin %100'ünde (ort TDT= $18,95 \pm 2,65$ mm) pozitif (Tablo 2). TDT negatif olan IS olgu grubundaki 13 olgunun 2'si DM'li, 3'ü KBY'li ve 8'i IS tedavi

Tablo 4: İmmünespresif olgularda TDT pozitifliğine göre QFT-GIT duyarlılığı

| | TDT pozitif n (%) | TDT negatif n (%) | Toplam n (%) |
|-----------------|-------------------|-------------------|--------------|
| QFT-GIT pozitif | 18 (85,7) | 3 (14,3) | 21 (100) |
| QFT-GIT negatif | 20 (66,7) | 10 (33,3) | 30 (100) |

TDT: Tüberkülin deri testi, QFT-GIT: Quantiferon TB-Gold-In tube

Tablo 5: İmmünespresif olgularda TDT ve QFT-GIT sonuçları arasındaki uyumluluk

| IS olgu grubu | QFT-GIT x TDT |
|---------------------------|---------------|
| Toplam uyum | 28/51 (54,9) |
| TDT pozitifliği için uyum | 18/38 (47,4) |
| TDT negatifliği için uyum | 10/13 (76,9) |
| κ katsayısı | 0,170 |

IS: İmmünespresif, QFT-GIT: Quantiferon TB-Gold-In tube, TDT: tüberkülin deri testi

Tablo 6: Olguların BCG skar sayılarına göre dağılımı

| Skar sayısı | IS olgu grubu n (%) | IS olmayan-LTB olgu grubu n (%) |
|-------------|---------------------|---------------------------------|
| 1 | 31 (60,8) | 3 (13,0) |
| 2 | 20 (39,2) | 16 (69,6) |
| 3 | - | 4 (17,4) |
| Toplam | 51 (100) | 23 (100) |

BCG: Bacillus-Calmette-Guerin, IS: İmmünespresif, LTB: latent tüberküloz

alan gruptaydı. QFT-GIT testi TDT negatif olan 2 DM'li olgunun 2'sinde de negatif, 3 KBY'li olgunun 1'inde pozitif ve 8 IS tedavi alan olgunun 2'sinde pozitif. Ortalama QFT-GIT düzeyleri IS olup TDT pozitif olan 38 olguda $0,92 \pm 1,50$ IU/mL olarak, IS olguların tümünde $0,77 \pm 1,35$ IU/mL ve IS olmayan-LTB olgularında $4,66 \pm 4,56$ IU/mL olarak bulundu. Ortalama QFT-GIT testi düzeyleri IS olmayan-LTB olgularında hem IS olguların tümüyle hem de IS olup TDT pozitif olanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksekti (sırasıyla, $p=0,001$, $p=0,002$). QFT-GIT testi pozitiflik oranı açısından IS olmayan-LTB olgu grubuyla IS olgu grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($X^2=3,667$, $p=0,055$). Gruplardaki QFT-GIT testi pozitiflik oranları Tablo 3'de sunulmuştur.

Sadece IS'li olgular değerlendirildiğinde; IS'li olgu grubunda TDT pozitif ve TDT negatif olgular arasında QFT-GIT testi pozitiflik oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($X^2=2,360$, $p=0,125$). Ayrıca bu grupta LTB tanısında TDT pozitifliği temel alındığında QFT-GIT testinin LTB'nin saptanmasındaki sensitivitesi %47, spesifitesi ise %77 olarak saptandı (Tablo 4).

IS'li olgular dikkate alındığında TDT ve QFT-GIT testi arasında düşük derecede bir uyum (%54,9, $\kappa=0,170$) olduğu görüldü (Tablo 5).

Çalışmaya alınan olguların tümünde BCG skarı →

**İMMÜNESPRESİF HASTALARDA
LATENT TÜBERKÜLOZ
ENFEKSİYONU TANISINDA
TÜBERKÜLIN DERİ TESTİ
İLE QUANTİFERON-TB GIT
TESTİNİN ETKİNLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

| Tablo 7: Skar sayısına göre QFT-GIT ve TDT değerleri | | | | |
|--|---------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| Skar sayısı | IS olgu grubu | | IS olmayan-LTB olgu grubu | |
| | TDT (mm) | QFT-GIT (IU/mL) | TDT (mm) | QFT-GIT (IU/mL) |
| 1 | 7,64±6,47 | 1,03±1,62 | 18,66±2,51 | 8,88±1,93 |
| 2 | 11,55±6,86 | 0,36±0,591,9 | 18,93±2,76 | 4,18±4,63 |
| 3 | - | - | 19,25±2,98 | 3,41±4,67 |

IS: İmmünespresif, LTB: latent tüberküloz, QFT-GIT: Quantiferon TB-Gold-In tube, TDT: tüberkülin deri testi

mevcuttu. Olguların BCG skar sayılarına göre dağılımı Tablo 6'da verilmiştir.

LTB'li grupta, BCG skar sayısına göre TDT ve QFT-GIT düzeyleri açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı (her iki değer için $p>0,05$). IS'li grupta ise BCG skar sayısı 2 olan olgularda BCG skar sayısı 1 olan olgulara göre TDT düzeyleri istatistiksel olarak yüksek iken ($p=0,049$), QFT-GIT düzeyleri açısından istatistiksel fark izlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 7).

Tüm olgular değerlendirildiğinde QFT-GIT testi ile TDT arasında pozitif korelasyon ($r=0,453$; $p=0,000$) saptandı (Şekil 1).

IS olgular kendi alt gruplarına göre incelendiğinde; DM'li olguların 10'u erkek, 6'sı kadın, yaş ortalaması 60,18±15,14, KBY'li olguların 9'u erkek, 7'si kadın, yaş ortalaması 58,50±20,43, IS ilaç tedavisi alan olguların 6'sı erkek, 13'ü kadın olup yaş ortalaması 53,73±12,72 idi. Bu üç alt grup arasında yaş ortalaması ($p>0,05$) ve cinsiyet dağılımı açısından ($X^2=4,016$, $p=0,260$) fark saptanmadı. Bu üç alt grup arasında ortalama TDT, BK ve albumin düzeyleri açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p>0,05$). Ortalama QFT-GIT düzeyleri KBY'li grupta DM'li olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düşük ($p=0,033$) olarak bulundu. Ortalama lenfosit sayısı en düşük olarak KBY'li grupta saptandı ve ortalama lenfosit sayısı açısından KBY ile DM'li grup arasında fark saptanmazken bu değer KBY'li grupta IS tedavi alan gruba göre istatistiksel olarak düşüktü ($p=0,006$) (Tablo 8).

TARTIŞMA

TDT, LTB enfeksiyonunun saptanmasında bazı dezavantajlarına rağmen tek ispatlanmış metottur.³ LTB enfeksiyonu için immun-yanıtı normal kişilerde testin sensitivitesi yaklaşık %100 iken immun sistemi baskılanmış kişilerde sensitivitesi düşebilir.^{11,12} INF- γ düzeyleri ölçüm testinin yüksek spesifitesi, *M. tuberculosis* maruziyeti ile daha iyi korelasyon göstermesi, BCG aşısı ve *M. tuberculosis* dışındaki mikobakteriler (NTM: Non-tuberculous mycobacteria) ile nispeten daha düşük çapraz reaksiyon oluşturması nedeniyle TDT'ye göre daha avantajlı olduğu ifade edilmektedir. Özellikle IS olan ve daha fazla TDT yanlış negatiflikleri izle-

nebilen hasta grubunda bu yöntem daha duyarlı gibi görünmektedir. Son dönemlerde yapılan iki olgu sunumu, TDT negatif olan IS olgularda INF- γ pozitifliğinin aktif TB'nin tanısında yardımcı bir faktör olabileceğini desteklemiştir.^{13,14}

Çalışmamızda IS olgu grubunda TDT pozitiflik oranı %74,5, QFT-GIT pozitiflik oranı ise %41,2 olarak bulunmuştur. TDT pozitif olguların ise %85,7'sinde QFT-GIT testi pozitif bulunmuştur. IS olgu grubunda olup TDT'leri negatif olan 13 olgunun 3'ünde QFT-GIT testi pozitif olarak saptanmıştır. IS olgularda LTB tanısında henüz altın standart bir tanı yöntemi olmaması nedeniyle bu 3 olgudaki yüksek QFT-GIT değerlerinin kesin olarak LTB'yi gösterip göstermeyeceği yorumu yapılamasa da en azından bu olguların reaktivasyon açısından takip edilmesi gerektiğini düşündürmüştür.

Herhangi bir nedenle immün yetersizliği olan kişilerde, çocuklarda, ekstrapulmoner veya NTM hastalığa sahip kişilerde ve yüksek riskli popülasyonun yaşadığı endemik ülkelerde INF- γ ölçüm testlerinin uygulanabilirliği ve geçerliliği hakkında yeterli delil yoktur.⁵ Son dönemlerdeki çalışmalar bu testin HIV ile enfekte ve immünespresif hastalarda ümit verici olduğunu göstermiştir.¹⁵⁻¹⁷ Bu grup hastalarda IFN- γ ölçüm testi TDT'ye göre anejiden daha az etkilenmektedir fakat bu durumun doğrulanması gerekmektedir.^{16,17} IS olgularda yapılan çalışmaların çoğunda LTB enfeksiyonunun tanısında bir "altın standart" olmadığı için IFN- γ ölçüm testlerinin sensitivitesi ve spesifitesi belirlenememiştir. Çalışmamızda IS olmayan olgularda LTB tanısı için altın standart olmasa da geçerli bir yöntem olan TDT ölçümleri temel alınarak değerlendirmeler yapıldı. Ortalama QFT-GIT testi düzeyleri LTB olgularında IS olgular ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmasına rağmen QFT-GIT testi pozitiflik oranı açısından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Sadece IS olgu grubu değerlendirildiğinde yine TDT pozitif ve negatif olgular arasında QFT-GIT pozitifliği açısından fark saptanmadı, ayrıca bu grupta QFT-GIT testinin TDT'ye göre LTB'nin saptanmasındaki sensitivitesi %47, spesifitesi ise %77 olarak saptandı. Bununla birlikte, IS olgularda TDT'nin yalancı negatifliği de dikkate alındığında gerçek LTB'li olguların sayısı bilinmeyeceğinden kesin sensitivite ve spesifitenin tanımı tam olarak yapılamaz. Romatoid artrit, Crohn Hastalığı ve spondilartropati nedeniyle anti TNF- α tedavisi başlanacak olgularda yapılan bir çalışmada CFP-10+ESAT-6 ELISPOT ve CFP-10 *in vitro* ölçüm testlerinin TDT ile karşılaştırıldığında bu grup hastalarda LTB tanısında daha yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu saptanmıştır.¹⁸ Bu çalışmada LTB enfeksiyonu tanısı için klinikoradyolojik bulguların varlığı temel alınmıştır. Olgular TDT'ye göre LTB'si →

olanlar (TDT 6-10 mm) ve klinikoradyolojik olarak kesin LTB'si olanlar olmak üzere 2 gruba ayrılmışlar ve TDT'ye göre LTB'nin var olarak kabul edildiği olguların çoğunda *in vitro* testlerin negatif olduğu görülmüştür. TDT negatif olan (≤ 5 mm) olgular ile TDT'si 6 ile 10 mm olan olgular arasında *in vitro* test sonuçları açısından istatistiksel fark saptanmamıştır. Klinikoradyolojik olarak kesin LTB kabul edilen olgularda, 13 olgunun 5'inde (%38,5) TDT negatif olarak bulunmuştur. Çalışmamızda IS grupta TDT negatif ve pozitif olgular arasında QFT-GIT testi pozitiflik oranları açısından fark saptanmadı. Bu da IS olgularda TDT'nin LTB'yi saptamada yeteri kadar duyarlı olmayacağını gösterebileceği gibi IS grupta TDT negatif olan olgularda QFT-GIT pozitifliğinin düşük olarak [%14,3 (3 olgu)] saptanması nedeniyle bir taraftan da QFT-GIT testinin ülkemiz şartlarında LTB'yi saptamada çok da uygun olmayacağını düşündürdü.

Piana ve ark.'ları 96 hematolojik hastalığı olan olguda TDT negatif, T SPOT TB test sonucu pozitif olan olgu oranını %35 olarak bulmuştur.¹⁹ Kronik inflamatuvar hastalıklar nedeniyle immunsupresif tedavi alan 142 olguda yapılan bir çalışmada QFT TB-GIT testi 142 olgunun 17'sinde pozitif bulunurken, TDT 46 olguda pozitif olarak saptanmıştır. Bu çalışmada QFT TB-GIT testi ile TDT arasındaki uyum %64 olarak saptanmış olup κ istatistiğine ($\kappa=0,17$) göre uyum düşük olarak yorumlanmıştır.²⁰ TB enfeksiyonu olan olgu ile temas öyküsü olan 138 hematolojik hastanın değerlendirildiği bir diğer çalışmada ise T-SPOT-TB testinin pozitifliği (%44,2) TDT pozitifliğine (%17,4) göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. Bu çalışmada bu iki test arasındaki uyumda %67,8 ($\kappa=0,34$, $p=0,0001$) olarak saptanmıştır.¹⁷ Bizim çalışmamızda da iki test arasındaki uyum düşüktü (%54,9, $\kappa=0,170$). Bu iki test arasındaki uyumun değerlendirildiği çalışmaların çoğunda orta derecede (%60-80) bir uyum olduğu ifade edilmekle birlikte κ istatistik sonuçları literatürlerde çok değişken (-0,03-0,87) olarak verilmiştir.⁵ BCG aşısı yapılmış olması ve TDT'nin yanlış negatifliğine neden olabilecek ileri yaş, alkolizm, renal yetersizlik, kortikosteroid tedavisi ve kanser gibi durumların varlığı bu iki test arasındaki uyumsuzluğu artıran nedenler olarak bildirilmiştir.^{21,22} IFN- γ ölçüm metodlarının farklılığı (ELISA veya ELISPOT) da sonuçların farklı olmasında etkilidir. Ayrıca çeşitli immunsupresif tedavilerde TDT ve IFN- γ ölçüm farklılıklarının oluşmasına neden olabilir.²⁰

Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] LTB tanısında *M. tuberculosis*'e spesifik IFN- γ ölçüm testlerini önermekte ve bu olguların LTB tedavisinden yüksek olasılıkla yarar göreceğini belirtmektedir. Fakat aynı yorum immunsistemi baskılanmış olgular için henüz

Tablo 8: İmmunsupresif olguların alt gruplarına göre TDT, QFT-GIT düzeyleri ve laboratuvar verileri

| | TDT (mm) | QFT-GIT (IU/mL) | BK | Lenfosit | Albumin |
|----------------|------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|
| DM (n=16) | 11,12±5,90 | 1,25±1,95 | 7,57±2,88 | 1,80±0,64 | 3,34±0,75 |
| KBY (n=16) | 8,00±5,22 | 0,42±0,82 | 8,07±3,88 | 1,31±0,73 | 3,18±0,89 |
| IS ilaç (n=19) | 8,52±8,53 | 0,66±1,01 | 8,66±2,37 | 2,28±1,42 | 3,90±1,42 |

BK: Beyaz küre, QFT-GIT: Quantiferon TB-Gold-In tube, TDT: tuberkülün deri testi, DM: diabetes mellitus, KBY: kronik böbrek yetersizliği, IS: immunsupresif

yapılmamakta ve bu yeni ölçüm sisteminin bu konuda yeterince deneyimli olmadığını ifade etmektedir.²³ Matulis ve ark.'nın çalışmasında otoimmün hastalık nedeniyle immunsupresif olgularda LTB'nin tanısında *M. tuberculosis* antijenine spesifik IFN- γ ELISA ölçüm testinin risk faktörleri varlığıyla daha yüksek birliklik göstermesi ve BCG aşısından daha az etkilenmesi nedeniyle TDT'ye göre daha etkili olduğu saptanmıştır.²⁰ Kutanoz anerji olasılığının daha yüksek olduğu KBY'si olan ve hemodiyalize giren olgularda yapılan bir çalışmada risk faktörlerinin varlığına (TB enfeksiyonunun varlığını düşündürecek radyolojik bulguların varlığı ve kendi ifadelerine göre daha önce aktif TB geçirme öyküsü) göre değerlendirildiğinde LTB'nin saptanmasında TDT, her 5 hastanın 4'ünde negatif iken T-SPOT TB test yaklaşık her dört hastanın 3'ünde pozitif olarak saptanmış ve önceki hastalık öyküsü olan olgularda T-SPOT TB testinin duyarlılığı %75 olarak bulunmuştur.¹⁶ Çalışmamızda 1 IS tedavi olan olguda TB temas öyküsü ve 1 DM'li olguda da geçirilmiş TB öyküsü mevcuttu. Hem olgu sayısının az olması hem de risk faktörlerinin olduğu olgu sayısı az olduğundan çalışmamızda her iki testin risk faktörleriyle olan ilişkisi istatistiksel olarak araştırılmamıştır.

İmmunsupresyonun derecesi (örn. CD4 lenfosit sayısı) ve indeterminate IFN- γ ölçüm sonuçları (mitojen uyarıya T hücre yanıt eksikliği) arasındaki korelasyon da araştırılması gereken önemli bir konudur.^{24,25} IS olgularda mitojene karşı reaktivitenin düşük olması nedeniyle indeterminate sonuçların elde edildiği bildirilmektedir.²⁴ T-SPOT-TB ve QFT-Gold testleri immunsupresif tedavi alma durumu yanında TDT'si negatif olgularda, çok genç olma veya ileri yaş gibi hücrel immun sistem yanıtını azaltan durumlardan etkilenebilmekte ve indeterminate sonuç oranı yükselmektedir.²⁶⁻²⁸ Ancak flow sitometrik olarak IS olgularda immun yanıtı normal olgulara göre recall antijenlerin reaktivitelerinin yüksek olduğu ve benzer şekilde ELISPOT testinin de HIV enfekte kişilerde kullanılabilirliği saptanmıştır.²⁹⁻³⁰ *In vitro* testlerle negatif sonuç elde edildiğinde yüksek olasılıkla LTB enfeksiyonunun dışlanabileceği fakat bu testlerin sadece yüksek riskli olgularda ve LTB saptandığında tedavi gereksinimi olan olgulara uygulanması gerektiği bildirilmiştir.³¹ Daha önce yapılan çalışmalarda QFT-TB test için indeterminate sonuçların IS tedavi alan özellikle lenfositopenik olgularda daha yüksek oranda →

**İMMUNSÜPRESİF HASTALARDA
LATENT TÜBERKÜLOZ
ENFEKSİYONU TANISINDA
TÜBERKÜLİN DERİ TESTİ
İLE QUANTİFERON-TB GIT
TESTİNİN ETKİNLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

gözlendiği belirtilmiştir.^{24,26} Bu olgularda lenfositopeni nedeniyle veya kortikosteroid alan olgularda IFN- γ üretiminin azalabileceği yorumları yapılmıştır.^{26,32}

Çalışmamızda QFT-GIT sonucu indeterminate olan 3 olgu saptandı, bu olgulardan 2'si immunsupresif tedavi alan, 1'i ise KBY'li olgu idi. Ortalama QFT-GIT düzeyleri en düşük olarak KBY'li grupta bulundu ve en düşük lenfosit sayısı da yine KBY'li olgularda saptandı. Bu da bize IFN- γ ölçüm testlerinin yorumlanması sırasında olguların lenfosit sayılarının da etkili olabileceği ve dikkate alınması gerektiğini düşündürdü.

QFT testinin BCG aşı durumundan etkilenmediği daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.^{33,34} Ferrara ve ark.'nın çalışmasında BCG ile aşılanmış olgularda TDT pozitifliği %83 ve QFT-GIT testi pozitifliği %28,3 olarak saptanmış ve BCG aşılanmış bireylerde BCG aşısızlara göre TDT ve QFT-GIT testinin arasındaki uyumun anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Bu in vitro ölçüm metodunun BCG aşılanmış bireylerde LTB enfeksiyonunun taranmasında spesifitesinin yüksek olduğu ifade edilmiştir.²⁴ Çalışmamızda BCG aşısız olgu olmadığı için BCG aşılanmış ve aşısızlar arasında TDT ve QFT-GIT testinin uyumu açısından analiz yapılamadı. Skar sayısına göre değerlendirdiğimizde ise

her iki grupta da skar sayısına göre QFT-GIT düzeyleri açısından istatistiksel olarak fark saptanmadı ve bu da QFT-GIT testinin skar sayısından etkilenmediği şeklinde yorumlandı.

Daha önce yapılan çalışmaların çoğunda biri hariç TDT (mm) ile IFN- γ yanıtı (IU/mL veya pg/mL) arasında orta veya güçlü korelasyon ($r=0,4-0,6$) olduğu saptanmıştır.³⁵⁻³⁹ Çalışmamızda da TDT ile QFT-GIT testi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.

Sonuç olarak çeşitli nedenlerle IS olan olgular ile IS olmayan ve TDT'ye göre LTB kabul ettiğimiz olgular arasında QFT-GIT pozitifliği açısından fark saptanmaması benzer şekilde IS olgu grubunda TDT negatif ve pozitif olgular arasında da QFT-GIT pozitifliği açısından fark saptanmaması, TDT ile QFT-GIT testi arasında pozitif korelasyon saptanması ayrıca her ne kadar kullanım kolaylığı olsa da maliyetinin de yüksek olması nedeniyle ülkemiz şartlarında IS olgularda QFT-GIT testinin TDT'ye göre çok da üstün olmadığı düşünüldü. Bu testin gerçek sensitivitesinin belirlenmesinde IS olup daha sonra aktif TB gelişen olguları ve spesifitesinin belirlenmesinde IS olup klinik-radyolojik-deri testi olarak LTB için negatif olan çok sayıda olguyu içeren longitudinal çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

İLETİŞİM İÇİN: Dr. Figen Deveci Firat Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD, 23119 Elazığ fgndeveci@yahoo.com
GÖNDERDİĞİ TARİH: 22 / 04 / 2010 • **KABUL TARİHİ:** 10 / 12 / 2010

KAYNAKLAR

1. Hamilton CD. Tuberculosis in the cytokine era: what rheumatologists need to know. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2085-2091.
2. Furst DE, Cush J, Kaufmann S, Siegel J, Kurth R. Preliminary guidelines for diagnosing and treating tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis in immunosuppressive trials or being treated with biological agents. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 62-63.
3. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 221-247.
4. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 968-975.
5. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 761-776.
6. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1860-1866.
7. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-1104.
8. Pai M, Gokhale K, Joshi R, et al. Mycobacterium tuberculosis infection in health care workers in rural India comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 2005; 293: 2746-2755.
9. Gümüslü F, Özkara S, Özkan S, Baykal F, Güllü Ü. Türkiye'de verem Savaşı, 2007 raporu. Verem Savaşı Daire Başkanlığı. Ankara, 2007.
10. Türkiye'de Tüberkülozün Kontrolü için Başvuru Kitabı. T.C. Sağlık Bakanlığı Verem Savaşı Daire Başkanlığı, 1. Baskı, Ankara: Rekmyay Ltd. Sti, 2003: 1-122.
11. Rose DN, Schechter CB, Adler JJ. Interpretation of the tuberculin skin test. *J Gen Intern Med* 1995; 10: 635-642.
12. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1860-1866.
13. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, et al. Reactivation of tuberculosis during immunosuppressive treatment in a patient with a positive QuantiFERON-RD1 test. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 499-501.
14. Richeldi L, Ewer K, Losi M, et al. Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 2004; 140: 709-713.
15. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, et al. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the M tuberculosis specific interferon-gamma test. *Respir Res* 2006; 7: 56.
16. Passalent L, Khan K, Richardson R, et al. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT. TB Test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 68-73.
17. Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2006; 28: 31-34.
18. Sellam J, Hamdi H, Roy C, et al. RATIO (Research Axed on Tolerance of Biotherapies) Study Group. Comparison of in vitro-specific blood tests with tuberculin skin test for diagnosis of latent tuberculosis before anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1610-1615.
19. Piana F, Codecasa LR, Besozzi G, Migliori GB, Cirillo DM. Use of commercial interferon-gamma assays in immunocompromised patients for tuberculosis diagnosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 130.
20. Matulis G, Juni P, Villiger PM, Gadola SD. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 84-90.
21. Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL, et al. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting

- latent Mycobacterium tuberculosis infection. JAMA 2001; 286:1740-1747.
22. Fietta A, Meloni F, Cascina A, et al. Comparison of a whole-blood interferon-gamma assay and tuberculin skin testing in patients with active tuberculosis and individuals at high or low risk of Mycobacterium tuberculosis infection. Am J Infect Control 2003; 31: 347-353.
 23. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Division of Tuberculosis Elimination, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep 2005; 54: 49-55.
 24. Ferrara G, Losi M, Meacci M, et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 2005; 172: 631-635.
 25. Pai M, Lewinsohn DM. Interferon-gamma assays for tuberculosis: is energy the Achilles' heel? Am J Respir Crit Care Med 2005; 172: 519-521.
 26. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study. Lancet 2006; 367: 1328-1334.
 27. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993; 17: 968-975.
 28. Meyer KC. Aging. Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 433-439.
 29. Sester M, Sester U, Gartner B, et al. Levels of virus-specific CD4 T-cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. Transplantation 2001; 71: 1287-1294.
 30. Chapman AL, 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: 2285-2293.
 31. Sester U, Junker H, Hodapp T, et al. Improved efficiency in detecting cellular immunity towards M. tuberculosis in patients receiving immunosuppressive drug therapy. Nephrol Dial Transplant 2006; 21: 3258-3268.
 32. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005; 24: 529-536.
 33. 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: 491-496.
 34. 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.
 35. Katial RK, Hershey J, Purohit-Seth T, et al. Cell-mediated immune response to tuberculosis antigens: comparison of skin testing and measurement of in vitro gamma interferon production in whole-blood culture. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 339-345.
 36. Arend SM, van Meijgaarden KE, de Boer K, et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with Mycobacterium marinum or M. kansasii. J Infect Dis 2002; 186: 1797-1807.
 37. Bellete B, Coberly J, Barnes GL, et al. Evaluation of a whole-blood interferon-gamma release assay for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection in 2 study populations. Clin Infect Dis 2002; 34: 1449-1456.
 38. Black GF, Fine PEM, Warndorff DK, et al. Relationship between IFN-gamma and skin test responsiveness to Mycobacterium tuberculosis PPD in healthy, non-BCG-vaccinated young adults in Northern Malawi. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5: 664-672.
 39. Black GF, Weir RE, Floyd S, et al. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. Lancet 2002; 359: 1393-1401.