

Akciğer tüberkülozunda Mycobacterium tuberculosis antijen fraksiyonlarına karşı serolojik yanıtın western blot yöntemiyle değerlendirilmesi

Evaluation of the serological response to Mycobacterium tuberculosis antigen fractions by western blotting method in pulmonary tuberculosis

Öz T¹ Çavuşoğlu C² Yaygın E³ Aydoğan Ö¹ Korkmaz M⁴ Bacakoğlu F¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³İzmir Büyükşehir Belediyesi Eşrefpaşa Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Bu çalışmada; aktif akciğer TB'li hastalarda sonikasyonla elde edilen M.tuberculosis antijen fraksiyonlarına karşı serolojik yanıtın Western blot yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem ve Gereç: Çalışmaya Eylül 2003-Eylül 2004 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda izlenen 34'ü aktif akciğer TB'li hasta, 29'u kontrol grubu olmak üzere toplam 63 birey alındı. Kontrol grubu; 12'si inaktif akciğer TB, 14'ü TCT pozitif sağlıklı, 3'ü ise TCT negatif sağlıklı bireylerden oluşturuldu.

Bulgular: Çalışmada; 34 aktif akciğer TB'li hastanın 22'sinde (duyarlılık %64.7) ve 29 kontrol grubu bireyin 3'ünde (özellik %89.7) 38 kDa'luk antijene karşı serolojik yanıt saptandı. Aktif akciğer TB grubunda; serolojik yanıt saptanan hastaların daha genç oldukları (39.7±17.2'ye karşı 53.3±19.1, p=0.04) ve kan örneklerinin tedavinin daha erken döneminde alınmış olduğu (3.9±5.2'ye karşı 8.6±7.7 gün, p=0.04) görüldü.

Sonuç: Sonuç olarak; bu çalışmada elde edilen duyarlılık ve özellik oranları, TB tanısında altın standart olan kültürün yerini alabilecek bir serolojik testten beklenen duyarlılık (%80) ve özellik (%95) oranlarının altındadır.

Anahtar Kelimeler : Akciğer tüberkülozu, Western blot, 38 kDa antijen.

Summary

Aim: The aim of this study was to evaluate serological response to M.tuberculosis sonicate antigen fractions by Western blotting method in active pulmonary TB.

Material and Methods: A total of 63 individuals, 34 active pulmonary TB and 29 control group, admitted to Ege University Medical Faculty, Department of Chest Diseases between September 2003 and September 2004 were included in the study. The control group was consisted of 12 inactive pulmonary TB, 14 TST positive healthy individuals and 3 TST negative healthy individuals.

Results: In the study, serological response to 38 kDa antigen was detected in 22 of 34 (sensitivity 64.7%) active pulmonary TB and in 3 of 29 (specificity 89.7%) control group. The seropositive cases in active pulmonary TB group were found to be younger (39.7±17.2 versus 53.3±19.1 yrs, p=0.04) and the blood samples had been taken in the earlier period of the treatment (3.9±5.2 versus 8.6±7.7. days, p=0.04).

Yazışma Adresi: Cengiz ÇAVUŞOĞLU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İZMİR
Makalenin Geliş Tarihi: 06.08.2009 Kabul Tarihi:07.09.2009

Conclusion:In conclusion, the sensitivity and specificity rates in this study are lower than the expected sensitivity (80%) and specificity (95%) rates of a serologic test which can be used instead of the gold standart microbiologic culture for the diagnosis of TB.

Keywords:Pulmonary tuberculosis, western blotting, 38 kDa antigen

Giriş

Tüberküloz (TB), tüm dünyada en sık mortalite ve morbiditeye yol açan enfeksiyon hastalıklarından biridir. Her yıl 8 milyon yeni TB hastası, 2 milyon TB'ye bağlı ölüm bildirilmektedir. Günümüzde akciğer TB'nin tanısında altın standart, klinik muayene ile birlikte yapılan balgamın direkt mikroskopik incelemesi ve kültürdür. Kültürde *M.tuberculosis*'in üremesi 8 haftaya kadar uzayabilmekte, olguların %10-20'sinde ise kültürde üreme olmamaktadır. Böyle hastalarda tanıya, klinik bulgular ve radyolojik inceleme ile gidilmektedir. Günümüzdeki tanı stratejileri ile, subklinik enfeksiyonların erken tanısı mümkün olmamaktadır (1).

Mycobacterium tuberculosis'in yapısında çok sayıda farklı antijenik komponent bulunur ve bunların büyük bir bölümü konak bağışıklık sistemiyle etkileşerek TB patogeneğinde önemli bir rol oynar. Tüberkülozun immünopatolojisi; temel olarak hücre aracılı bağışıklık yanıtına ve doku hasarına bağlı olarak ortaya çıksa da, enfeksiyonun seyri sırasında çok sayıda antijene karşı antikor yanıtı da oluşur. Ayrıca enfeksiyonun süresi ve ağırlığı, antikor yanıtını değiştirebilir. Bu nedenle enfeksiyonun ve hastalığın çeşitli aşamalarındaki bağışıklık yanıtının bilinmesi ve bu antijenlerin tanımlanması, hastalığın önlenmesinde ve serolojik tanısında kullanılacak yöntemlerin geliştirilmesinde yararlı olabilir. Bununla birlikte, antikor yanıtı çok farklı ve geniş bir antijen grubuna karşı oluşur. Ayrıca, yanıt bireyler arasında büyük farklılıklar gösterir ve genellikle duyarlılıkları da düşüktür (1).

Bu çalışmada; aktif akciğer TB'li hastalarda *M.tuberculosis*'in sonikasyonla elde edilen antijen fraksiyonlarına karşı serolojik yanıtın Western blot yöntemiyle saptanması ile serolojik testlerle sağlıklı, enfekte ve hasta bireylerin birbirinden ayrılabilmesini sağlayabilecek bir serolojik yanıt olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hastaların seçimi: Eylül 2003-Eylül 2004 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda izlenen 34'ü aktif akciğer TB, 29'u kontrol grubu olmak üzere toplam 63 birey çalışmaya alındı. Kontrol grubu 12'si inaktif akciğer TB, 14'ü tüberkülin cilt testi (TCT) pozitif sağlıklı, 3'ü ise TCT negatif sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Aktif akciğer TB tanısı, klinik ve radyolojik bulgular temel alınarak, mikrobiyolojik olarak konuldu. Klinik ve radyolojik değerlendirmeyi takiben, birbirini izleyen en az iki alt solunum yolu örneğinin direkt bakısı (DB) pozitif ve/veya en az bir alt solunum yolu örneğinin kültüründe üreme olan hastalar, aktif akciğer TB olarak değerlendirildi. Hastaların demografik özellikleri, genel ve solunumsal semptomları ve süreleri, radyolojik bulguları ile TCT ve mikrobiyoloji sonuçları kayıt edildi.

Serum örneklerinin toplanması: Tüberküloz tanısı alan hastalardan, en geç tedavinin ilk 3 haftası içinde 1 kez kan örneği alındı. Ayrıca, kontrol grubunu oluşturan bireylerden de 1 kez kan alındı. Alınan kan örneklerinin serumları ayrılarak, kriyotüpler içinde çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

Antijen eldesi: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv kökeni Middlebrook 7H9 sıvı besiyerinde, 2-3 hafta süreyle çoğaltıldı. Üreyen bakteriler eppendorf tüplere transfer edildi ve 1200 rpm'de 15 dakika çevrilerek yoğunlaştırıldı. Üstte kalan sıvı atıldı, pellet 1 ml PBS ile sulandırıldı. Sulandırılmış pellet sıvı nitrojen içinde 5 dakika süreyle donduruldu ve ardından oda ısısında çözünmesi beklendi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Süspansiyon, 4°C'de 20 dakika sonike edildi. Sonikasyonun ardından, süspansiyon 1200 rpm'de 5 dakika çevrildi. Elde edilen süpernatant, antijen olarak kullanıldı.

Elektroforez: Elde edilen antijen, Bio-Rad Mini-protean III elektroforez cihazında SDS-PAGE ile Schagger ve von Jugow (2) tarafından tanımlanan yöntemle göre fraksiyonlarına ayrıldı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarını

değerlendirebilmek için, önceden boyanmış protein standardı (Prestained Molecular Weight Marker, SM0441, Fermentas) kullanıldı. Fraksiyonlarına ayrılan antijenler görüntülenmeleri için jel Coomassie brilliant blue G250 (Merck 15444) ile boyandı.

Western blot (WB): Jelde fraksiyonlarına ayrılan antijen, nitroselüloz membrana (Schleicher&Schuell) aktarıldı. Antijenle kaplanmış membran, cetvel ve bistüri yardımıyla 0.25 cm'lik şeritler halinde kesildi. Her bir hasta serumu için bir şerit kullanılarak, TBS-kazein ile 1:100 oranında sulandırılmış serum örnekleri oda ısısında yatay karıştırıcıda inkübe edildi. Daha sonra şeritler, alkalin fosfataz işaretli anti-human IgG konjuge (κ-chain specific, Sigma A-3187) ile oda ısısında yatay karıştırıcıda inkübe edildi. Son aşamada bantları görünür hale getirmek için, BCIP içeren substrat kullanıldı. Yeterli yoğunlukta bir bant oluşunca şeritler substrattan çıkartıldı ve kurutuldu. Şeritlerde *M. tuberculosis* H37Rv'nin 38 kDa'luk protein fraksiyonuna uyan bölgedeki antijene karşı antikor yanıtının saptanması, pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme: İstatistiksel değerlendirme için, χ^2 Student's t test ve Fisher's exact test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için, p değerinin p<0.05 olması kabul edildi.

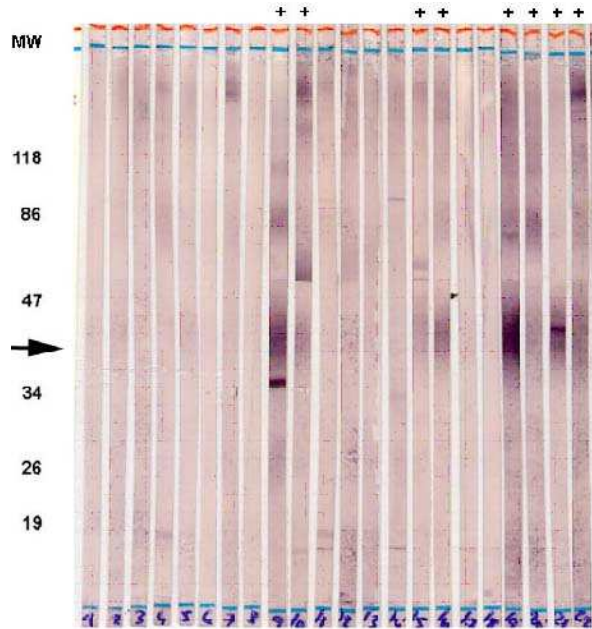
Bulgular

Eylül 2003-Eylül 2004 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'nda aktif akciğer TB tanısı alan hastalar (n=34, yaş ort 44.5±18.8, K/E:7/27) çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubuna (n=29, yaş ort 45.5±17.3, K/E:16/13) ise, inaktif akciğer TB (n=12), TCT pozitif sağlıklı (n=14) ve TCT negatif sağlıklı (n=3) bireyler alındı.

Hasta ve kontrol serumlarında WB yöntemi ile *M. tuberculosis* H37Rv kökeninin çeşitli protein fraksiyonlarına karşı serolojik yanıt elde edilmesine karşın, serolojik yanıtın değerlendirilmesi için en uygun bölgenin 38 kDa'luk antijene uyan bölge olduğu saptandı. Şekil 1'de; 38 kDa'luk antijen temel alınarak yapılan değerlendirmede elde edilen pozitif ve negatif WB sonuçlarına ait bant paternleri gösterilmiştir.

Otuz dört aktif akciğer TB hastasının 22'sinde, 38 kDa'luk antijenine karşı serolojik yanıt (duyarlılık % 64.7)

saptandı. Çalışmada, aktif akciğer TB grubunda yer alan hastalarda serolojik yanıtı etkileyen parametreler araştırıldı. Serolojik yanıt saptanan hastaların; daha genç (39.7±17.2'ye karşı 53.3±19.1, p=0.04) ve serum örneklerinin tedavinin daha erken döneminde alındığı (3.9±5.2'ye karşı 8.9±7.7 gün, p=0.04) saptandı. Eşlik eden hastalıklar, TCT, solunumsal ve diğer semptomların varlığı ve süresi, radyolojik yaygınlık ve lezyon karakteri, alt solunum yolu örneğinin DB ve kültür sonuçları ile ilaç direncinin, serolojik yanıtı etkilemediği görüldü (Tablo 1).



Şekil 1: 38-kDa'luk antijen temel alınarak yapılan değerlendirmede elde edilen pozitif ve negatif WB sonuçlarına ait bant paternleri

MW: Moleküler ağırlık kontrolü (118 kDa, 86kDa, 47 kDa, 34kDa, 26 kDa ve 19 kDa)

+: Pozitif olarak değerlendirilen serum örnekleri

→: 38 kDa'luk antijene uyan bölge

Kontrol grubundaki 29 bireyin 3'ünde (özgüllük %89.7) WB ile pozitif serolojik yanıt saptandı. Bu üç bireyin ikisi inaktif akciğer TB ve diğeri sağlıklı gruptan olup, tümünde TCT pozitifliği.

Tablo 1. Aktif akciğer tüberkülozu tanısı alan hastalarda serolojik yanıt ve çeşitli parametreler arasındaki ilişki.

PARAMETRELER	SEROLOJİ (+) (n=22)	SEROLOJİ (-) (n=12)	p
CİNSİYET(K:E) (%)	4:18 (%81.8)	3:9 (%75)	NS
YAŞ (yıl) (Ort±SD)	39.7±17.2	53.3±19.1	0.04
EK HASTALIK (var: yok) (%)	6:16 (%72.7)	6:6 (%100)	NS
TCT (+:-) (%)	15:7 (%68.2)	8:4 (%66.7)	NS
TCT (mm olarak)	10.0±7.2	10.5±9.2	NS
SEMPATOM SÜRESİ (gün) (Ort±SD)	78.9±83.5	75.8±97.1	NS
SOLUNUMSAL SEMPTOM VARLIĞI (var: yok) (%)	20:2 (%90.9)	9:3 (%75)	NS
AKCİĞER GRAFİSİ:			
Multi-zon (var: yok) (%)	14:8 (%63.6)	5:7 (%41.7)	NS
Kavite (var: yok) (%)	16:6 (%72.7)	8:4 (%66.6)	NS
ALT SOLUNUM YOLU ÖRNEĞİ:			
DB (+:-) (%)	21:1 (%95.5)	11:1 (%91.7)	NS
Kültür (+:-) (n%)	22:0 (%100)	12:0 (%100)	NS
İlaç direnci (var:yok) (%)	3:19 (%13.6)	1:11 (%8.3)	NS
TEDAVİ SÜRESİ (gün) (Ort ±SD)	3.9±5.2	8.9±7.7	0.04
DIYABET VARLIĞI (var: yok) (%)	3:19 (%13.6)	1:11 (%8.3)	NS
MALİGNİTE VARLIĞI (var: yok) (%)	0:22 (%0)	2:10 (%16.7)	NS
GENEL SEMPTOM VARLIĞI (var: yok) (%)	17:5 (%77.3)	10:2 (%83.3)	NS

TCT= Tüberkülin cilt testi, DB= Direkt bakısı, NS= Non-significant.

Tartışma

Tüberkülozun serolojik tanısı amacıyla yapılan çalışmalarda; ELISA temelli yöntemler, immünokromotografik yöntemler ve WB kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile, başta 38 kDa'luk antijen olmak üzere, çeşitli rekombinan veya doğal antijenlere karşı serolojik yanıt değerlendirilmektedir (3, 4, 5). Bu çalışmada, WB yöntemiyle *M.tuberculosis* H37Rv kökeninin çeşitli protein fraksiyonlarına karşı serolojik yanıt araştırıldı. Serolojik yanıtın değerlendirilmesi için en uygun bölgenin, 38 kDa'luk antijene uyan bölge olduğu saptandı.

Otuz dört aktif akciğer TB hastasının 22'sinde (duyarlılık %64.7), kontrol grubundaki 29 bireyin ise üçünde (özellik %89.7), WB ile 38 kDa'luk antijene karşı serolojik yanıt saptandı. WB ile serolojik yanıt saptanan üç hastanın ikisi inaktif akciğer TB, biri sağlıklı gruptandı; ayrıca bu bireylerin tümünün TCT'si de pozitif. Aktif akciğer TB tanısı alan 34 hastanın tümünde kültürde üreme saptanırken, 32 hastanın (%94.1) ayrıca DB'si de pozitif. İmmünokromotografik temelli bir test olan "ICT Tuberculosis" ile yapılan çalışmalarda; DB ve/veya kültür pozitif akciğer TB hastalarında duyarlılık Çin'de %92, Madagaskar'da %65.2, ABD'de %46, İtalya'da %66.7, özellik ise sırasıyla %92, %83.3, %89 ve %90.4 olarak bulunmuştur (3, 6, 7, 8). Sonike edilmiş *M.tuberculosis*

H37Rv antijen ekstratlarıyla yapılan bir WB analizinde ise, 38 kDa'luk antijene karşı serolojik yanıt DB pozitif akciğer TB'de %52.4 olarak saptanmıştır (9). Bizim çalışmamızda elde edilen duyarlılık ve özellik oranları, DB pozitif akciğer TB'li hastalarda 38 kDa'luk antijene karşı elde edilen serolojik yanıtla benzerlik göstermektedir. Sunulan çalışmadaki hastaların çok büyük bir bölümünde DB pozitif olduğundan, DB'nin serolojik yanıtta etkisi değerlendirilememiştir. Bununla birlikte çalışmalardan elde edilen bulgular; duyarlılığın DB pozitif hastalarda, DB negatiflerden, akciğer TB'li hastalarda ekstrapulmoner tüberkülozlulardan daha yüksek olduğunu göstermektedir (3).

Bazı çalışmalarda, kronik kaviter hastalığı bulunanlarda, 38 kDa'luk antijene karşı daha yüksek oranda antikor yanıtı geliştiği saptanmıştır (10, 11). Antitüberküloz tedavinin ise, antikor yanıtı üzerine etkisi tartışmalıdır. Antikor düzeylerindeki artış ile hastalığın yaygınlığı, hastalığın ve tedavinin süresi arasında ilişki bulunan çalışmaların tersine, böyle bir ilişkinin olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (3, 12, 13, 14). Bizim çalışmamızda serolojik yanıt saptanan 22 hastanın 14'ünde (%63.3) multizon, 16'sında (%72.7) ise kavite saptanırken, serolojik yanıt elde edilmeyen 12 hastanın beşinde (%41.7) multizon, sekizinde (%66.6) ise kaviter lezyon saptandı. Aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, yaygın ve kaviter lezyonu bulunan

aktif akciğer TB hastalarında serolojik yanıt oranlarının daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca bu çalışmada, tedavi süresinin uzunluğu ile serolojik yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu.

Bizim çalışmamızda; ileri yaşlarda serolojik yanıtta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmasına karşın, literatürde yaşla serolojik yanıt arasında ilişki kuran bir çalışma bulunmamıştır. Bu çalışmada; serolojik yanıt saptanan grupta yaş ortalaması 39.7 ± 17.2 , saptanmayan grupta ise 53.3 ± 19.1 olarak bulunmuştur. Bu durum, çalışmada yer alan ileri yaş grubundaki hastaların aynı zamanda tedavi sürelerinin de daha uzun olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan çalışmalarda, tüberküloz sırasında başta 38 kDa'luk antijen olmak üzere çok sayıda *M.tuberculosis* antijenine (19 kDa, 14 kDa, ESAT-6, MTC28, MPT63, MPT51, MPT64, MPT32, MTC28 ve Mtb81) karşı serolojik yanıt araştırılmıştır. Hastalığın seyri sırasında çok sayıda, farklı mikobakteriyel antijene karşı antikor yanıtı olduğu, tüm hastaların immün sistemi tarafından tanınan tek bir ortak antijen ya da antijen setinin olmadığı saptanmıştır (12, 15, 16, 17). Bizim çalışmamızda, 38 kDa'luk antijen dışında yeterli duyarlılık ve özgüllükte serolojik yanıt alınan başka bir antijen saptanmadı.

Tüberkülozlu hastalardan elde edilen T hücrelerinin çok farklı *M.tuberculosis* antijenlerini tanıma paterni gösterdikleri bilinmektedir. Antijen tanımadaki bu heterojenite nedeniyle az sayıda pürifiye antijenin kullanıldığı durumlarda, hastaların yaklaşık %30'unda serolojik yanıt saptanamamaktadır. Yapılan çalışmalarda tüberküloz hastalarında geniş bir antijen seti kullanıldığında, hastaların yaklaşık %90'ında serolojik olarak reaktif bir antijen saptandığı gösterilmiştir (9, 12). Bu nedenle çok sayıda farklı antijeni içeren kokteyl antijenlerin bağışık yanıtta gözlenen bu farklılıkları

kapsayacağı ve tüberkülozun immünolojik tanısına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip bir serolojik tanı testi geliştirmek için; kritik epitopları içeren, farklı rekombinan antijenlerden veya bir füzyon poliproteinden oluşmuş bir panele ihtiyaç olacaktır.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları vardır. Öncelikle; kontrol grubu olarak alınan, özellikle TCT negatif birey sayısı yeterli değildir. Yanı sıra; çalışma ve kontrol grubu arasında cinsiyet dağılımı açısından uyumsuzluk mevcuttur. Ek olarak; anti-tüberküloz tedavi başlanması serolojik yanıtı etkilediğinden, kan örneklerinin tedavi başlanmadan önce alınmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

Sonuç

Serolojik yanıtta düşük duyarlılığın; tüberküloz hastalarındaki sıvısal immün yanıtın yetersizliğinden değil, bu antikorları saptayacak uygun test formatlarının oluşturulamamasından kaynaklanıyor olabileceği, yaygın kabul gören bir görüştür. Son yıllarda tüberkülozda sıvısal bağışıklık yanıtının değerlendirildiği çalışmalar yapılmaktadır. Bu tür hızlı serolojik testlerin, klasik yöntemlerin yararlı olmadığı hastalarda, başarılı ve ekonomik bir alternatif olması beklenmektedir. DSÖ'nün önerilerine göre; altın standart olan bakteriyolojik kültürün yerine kullanılacak bir serolojik testin duyarlılığının en az %80, özgüllüğünün ise %95'in üzerinde olması gerekmektedir (18). Bu kriterler temel alındığında, günümüzde kullanımda olan serolojik testlerin, tüberkülozun standart tanısında kullanılan yöntemlerin yerini alması, henüz mümkün görünmemektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin 03/TIP/033 nolu projesi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. Lancet. 2000;356:1099-104.
2. Schägger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem. 1987;166:368-79.
3. Bartoloni A, Strohmeyer M, Bartalesi F, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the serologic diagnosis of tuberculosis in Italy. Clin Microbiol Infect. 2003;9:632-9.
4. Katti MK. Immunodiagnosis of tuberculous meningitis: rapid detection of mycobacterial antigens in cerebrospinal fluid by reverse passive hemagglutination assay and their characterization by Western blotting. FEMS Immunol Med Microbiol. 2001;31:59-64.
5. Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2000;38:2227-31.

6. Cole RA, Lu HM, Shi YZ, et al. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. *Tuber Lung Dis.* 1996;77:363-8.
7. Rasolofo V, Rasolonavalona T, Ramarokoto H, Chanteau S. Predictive values of the ICT Tuberculosis test for the routine diagnosis of tuberculosis in Madagascar. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:184-5.
8. Mathur ML, LoBue PA, Catanzaro A. Evaluation of a serologic test for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1999;3:732-5.
9. Franco J, Camarena JJ, Nogueira JM, et al. Serological response (Western blot) to fractions of *Mycobacterium tuberculosis* sonicate antigen in tuberculosis patients and contacts. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2001;5:958-62.
10. Samanich K, Belisle JT, Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun.* 2001;69:4600-9.
11. Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, et al. Surrogate marker of preclinical tuberculosis in human immunodeficiency virus infection: antibodies to an 88-kDa secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1997;176:133-43.
12. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, et al. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun.* 1998;66:3936-40.
13. Verbon A, Weverling GJ, Kuijper S, et al. Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:378-84.
14. Zhou AT, Ma WL, Zhang PY, Cole RA. Detection of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients with the 38-kilodalton antigen from *Mycobacterium tuberculosis* in a rapid membrane-based assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3:337-41.
15. Gennaro ML. Immunologic diagnosis of tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 2000;30:243-46.
16. Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds LD, et al. Mass spectrometric identification of mtb81, a novel serological marker for tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2354-61.
17. Beck ST, Leite OM, Arruda RS, Ferreira AW. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:587-96.
18. World Health Organization. WHO Tuberculosis Diagnostics Work-shop: product development guidelines, 1997. 1-27.