

Avaliação do desempenho de um teste sorológico rápido utilizando quatro antígenos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar

Evaluation of a rapid serologic test with four antigens for the pulmonary tuberculosis diagnosis

Marcus B. Conde¹, Gilvan Renato Muzy de Souza¹, Lucia M.O. Vicentini², Ana Luiza Fernandes¹, Juliana Ribeiro de Carvalho¹, Afrânio L. Kritski¹

RESUMO

Introdução: Os testes sorológicos não fazem parte da rotina da investigação diagnóstica da tuberculose pulmonar. **Métodos:** Um teste imunocromatográfico (ICT-TB) utilizando quatro diferentes antígenos purificados para pesquisa de anticorpo IgG foi avaliado em 268 amostras de soro de 69 casos de tuberculose pulmonar, 41 de doença não tuberculosa, 12 de seqüela de tuberculose, 107 controles saudáveis e 39 contatos domiciliares de tuberculose pulmonar. **Resultados:** A sensibilidade foi 54 % e a especificidade 86%. Entre os contatos domiciliares o ICT-TB foi positivo em 10 %. **Conclusão:** Concluímos que a sensibilidade e a especificidade do teste sorológico ICT-TB conferiu a ele pouco valor para o diagnóstico de tuberculose pulmonar na nossa amostra.

ABSTRACT

Introduction: Serologic tests are not routinely used for the diagnostic investigation of pulmonary tuberculosis. **Methods:** An immunochromatographic test (ICT-TB) using four different purified antigens against an IgG antibody was evaluated in 268 serum samples of 69 patients with pulmonary tuberculosis, 41 with a nontuberculous disease, 12 subjects with healed pulmonary tuberculosis and 107 healthy volunteers and 39 close contacts of pulmonary tuberculosis patients. **Results:** Sensitivity was 54% and specificity 86 %. Among close contacts, ICT-TB was positive in 10%. **Conclusion:** We concluded that sensitivity and specificity of ICT-TB test made it a poor diagnostic tool for pulmonary tuberculosis diagnosis in our sample.

Descritores: testes sorológicos; tuberculose pulmonar; diagnóstico; imunocromatografia

Key-words: serologic test; pulmonary tuberculosis; diagnosis; immunochromatography

1. Unidade de Pesquisa em Tuberculose. Instituto de Doenças do Tórax da Universidade Federal do Rio de Janeiro

2. Instituto Estadual de Doenças do Tórax Ary Parreiras. Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro

Correspondência: Marcus B. Conde

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Av. Brigadeiro Trompowsky, s/nº, 4º andar, Unidade de Pesquisa em Tuberculose - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ - Brazil - CEP 21941-590.

e-mail: marcusconde@hucff.ufrj.br

Artigo recebido no dia 20/12/2002 e aceito no dia 03/02/2003, após revisão.

Introdução

A tuberculose (TB) continua sendo um sério problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1997 foram notificados 7,96 milhões de novos casos e ocorreram 1,87 milhões de óbitos por TB em todo o mundo.⁽¹⁾ No Brasil, em 1998, foram notificados 82.931 casos novos dos quais 9.842 ocorreram na cidade do Rio de Janeiro.^(2,3)

A melhor estratégia para o combate à TB é a sua prevenção através da detecção e cura dos doentes. Assim, quanto mais rápido e precoce for o diagnóstico da TB, mais eficaz será o combate a esta doença. Os dois métodos mais utilizados para o diagnóstico de TB, a demonstração da presença do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) no espécime clínico através da coloração de Ziehl-Neelsen e a cultura para micobactéria em meio específico, têm limitações para o diagnóstico da TB pulmonar. Em função da necessidade de novos testes diagnósticos para a TB, várias novas técnicas vêm sendo testadas nos últimos anos como por exemplo as sondas de ácidos nucleicos, os testes de amplificação, a cromatografia líquida de alta resolução, os sistemas radiométricos e não radiométricos de detecção de crescimento de micobactérias em meios líquidos e as técnicas sorológicas.⁽⁴⁾ Embora as técnicas sorológicas para o diagnóstico da TB sejam estudadas desde 1898 (*apud* Daniel e Debanne)⁽⁵⁾, problemas com sensibilidade, especificidade, além de dificuldades técnicas, fizeram com que a sorologia para TB fosse abandonada. Entretanto, a partir da descrição de novas técnicas e novos antígenos o interesse pelas técnicas sorológicas no diagnóstico da TB ganhou novo impulso.⁽⁶⁾ A demonstração recente que na maioria dos soros de indivíduos com TB existem anticorpos circulantes contra pelo menos um antígeno, suscitou a possibilidade da utilização de vários antígenos purificados de forma simultânea como forma de aumentar a sensibilidade.^(7,8)

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade e a especificidade de um teste sorológico rápido para o diagnóstico de TB pulmonar, que utiliza a técnica de imunocromatografia (ICT) para a pesquisa de anticorpos IgG contra quatro diferentes antígenos purificados, entre eles o 38 kDa, em indivíduos HIV soronegativos.

Material e métodos

Soros utilizados

Foi realizado um estudo de avaliação de teste diagnóstico em soros provenientes do banco de soros da Unidade de Pesquisa de Tuberculose (UPT) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram avaliados soros de pacientes com 18 anos de idade ou

mais, portadores de TB pulmonar, de outras doenças pulmonares que não a TB e com seqüela de TB pulmonar. Foram também estudados os soros de controles saudáveis e de indivíduos assintomáticos com história de contato domiciliar recente com paciente com TB pulmonar bacilífera em acompanhamento no ambulatório do Programa de Controle da Tuberculose Hospitalar (PCTH) do HUCFF/UFRJ. Todos os soros foram coletados no período de 1º de junho de 1997 a 31 de março de 1999, armazenados à temperatura de 20º Celsius negativos e descongelados uma só vez antes da utilização neste experimento. Todos os testes sorológicos foram realizados no período de abril a julho de 2000. Não foram incluídos soros de pacientes ou voluntários que não assinaram termo de consentimento para utilização do soro, de mulheres grávidas e/ou de pacientes com derrame pleural líquido e/ou com diagnóstico de asma brônquica e/ou com teste HIV positivo e/ou com história de tratamento antituberculose por mais de uma semana nos três meses que antecederam a coleta do soro e/ou com sinais clínicos, durante o exame físico, de falência respiratória e/ou cardíaca. Foram excluídos do estudo os soros de pacientes em cujo material pulmonar (escarro espontâneo ou escarro induzido ou lavado broncoalveolar) foi observada contaminação da cultura para micobactéria, cujo diagnóstico clínico de TB pulmonar (diagnóstico de probabilidade) não foi confirmado durante o acompanhamento e aqueles que não tiveram seguimento clínico durante, pelo menos, seis meses após a coleta do soro.

Todos os indivíduos incluídos neste estudo, exceto os controles saudáveis, foram submetidos à telerradiografia de tórax em incidência pósterio-anterior e perfil e ao teste anti-HIV (método de ELISA - Organon Teknika, Holanda – com confirmação por *Western blot* - Dupont, EUA) e tiveram pelo menos uma amostra de escarro espontâneo coletada. Aqueles que não foram capazes de expectorar espontaneamente foram submetidos à indução de escarro pela técnica descrita por Bigby e cols.⁽⁹⁾ O escarro coletado foi submetido à pesquisa direta de BAAR e fungos, cultura para micobactéria e fungos, além de pesquisa de células malignas. Todos os voluntários assintomáticos e os contatos assintomáticos de TB foram submetidos ao teste tuberculínico cutâneo (TTC) com PPD.

A sorologia pela técnica imunocromatográfica (ICT)

A sorologia pela técnica imunocromatográfica (ICT) foi realizada utilizando uma nova geração do *kit* diagnóstico (AMRAD ICT, Sydney, Austrália), ainda não disponível comercialmente e gentilmente cedido pelos

fabricantes. Neste *kit*, além do antígeno 38 kDa, existem mais três novos antígenos recombinantes não revelados pelo fabricante por questões de segurança da patente. Este *kit* consiste em um dispositivo de papelão com uma dobra no meio, na forma de um cartão (Figura 1). A face interna direita do cartão contém uma tira de nitrocelulose (6mm x 22 mm), sobre a qual o antígeno 38kDa e mais três outros antígenos recombinantes foram aplicados e estão imobilizados, cada um correspondendo a uma linha vertical na tira de nitrocelulose. No alto e na base da tira de celulose há uma pequena faixa de 10mm x 6mm de tamanho (Ahlstrom Filtration, Mount Holly Springs, USA), que corresponde a uma delicada e fina almofada absorvente e que ultrapassa a fita de celulose em 1 milímetro. O objetivo desta faixa é fazer correr o líquido nela depositado. Na parte lateral da face interna direita há uma fita que pode ser facilmente removida, dando lugar a uma fita adesiva que pode ser utilizada para manter juntas as duas faces internas do cartão. Na parte central do lado esquerdo do cartão há uma pequena abertura (12 mm x 10mm), como se fosse uma janela. Na face interna deste mesmo lado esquerdo, situado abaixo da janela, há uma pequena almofada, chamada de almofada conjugada, na qual 5 μ l de anticorpo de cabra antiimunoglobulina G humano conjugado ligado a 40nm de ouro coloidal, foi colocado e secado. Existe ainda uma espessa almofada absorvente de 15mm x 10mm na parte inferior da pequena janela.

O teste foi realizado com a colocação de 2 gotas da solução tampão na parte interna esquerda inferior que continha o conjugado. O passo seguinte foi colocar 30 μ l de soro na almofada de papel absorvente localizada na parte superior da fita de celulose na face interna direita do cartão. Este volume de soro se alastrava através da almofada em direção à linha limite no centro da fita de celulose. Quando o soro alcançava a linha limite, uma

gota da solução tampão era pingada no papel-almofada localizado na parte inferior da fita de celulose. Após isto, a fita da borda lateral era removida dando lugar a uma fita adesiva, e as duas faces internas do cartão eram aproximadas e fixadas firmemente. Com isto, a almofada contendo o conjugado anticorpo de cabra antiimunoglobulina G humano ligado a 40 nm de ouro coloidal se juntava à fita de celulose com os antígenos e sobre a qual o soro havia se alastrado. Na presença de anticorpo IgG fixado a uma das faixas contendo antígeno, havia uma reação com o anticorpo antiimunoglobulina G humano do conjugado provocando o surgimento de uma faixa de coloração rosa. A leitura foi realizada 15 minutos após o fechamento do cartão. O teste foi considerado positivo quando, além do surgimento de uma linha correspondente ao controle, surgiram uma ou mais linhas correspondentes à reação com o anticorpo.

Análise dos dados

A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos foram calculados. Para comparações das diferenças nas freqüências dos resultados positivos e negativos nos grupos avaliados foi utilizado o teste do qui-quadrado com ou sem a correção de Yates, para a continuidade nos casos, e o teste exato de Fisher, quando indicado. Em todos os testes, o nível de significância adotado foi o de 5%.

Resultados

Foram avaliados os soros de 268 indivíduos HIV soronegativos. Na tabela 1 é mostrada a distribuição dos grupos, da idade, do gênero e da cor. O item cor não foi preenchido na ficha de 20 pacientes com TB, 2 com seqüela de TB e 28 com outras doenças.

Houve diferença significativa entre a média de idade dos pacientes com TB e a média de idade dos controles assintomáticos e dos casos com seqüela de TB.

Na tabela 2 são apresentados os resultados da sorologia ICT-TB no soros nas diferentes formas de TB pulmonar e nos diferentes grupos de controles estudados.

A sensibilidade global do ICT-TB com quatro antígenos foi 54% (37/69). Entre os 189 indivíduos sem TB, o teste foi positivo no soro de 28 indivíduos, com uma especificidade de 85% (161/189). Entre os pacientes portadores de TB pulmonar com baciloscopia positiva de escarro, o teste teve

Figura 1 - O dispositivo para a ICT

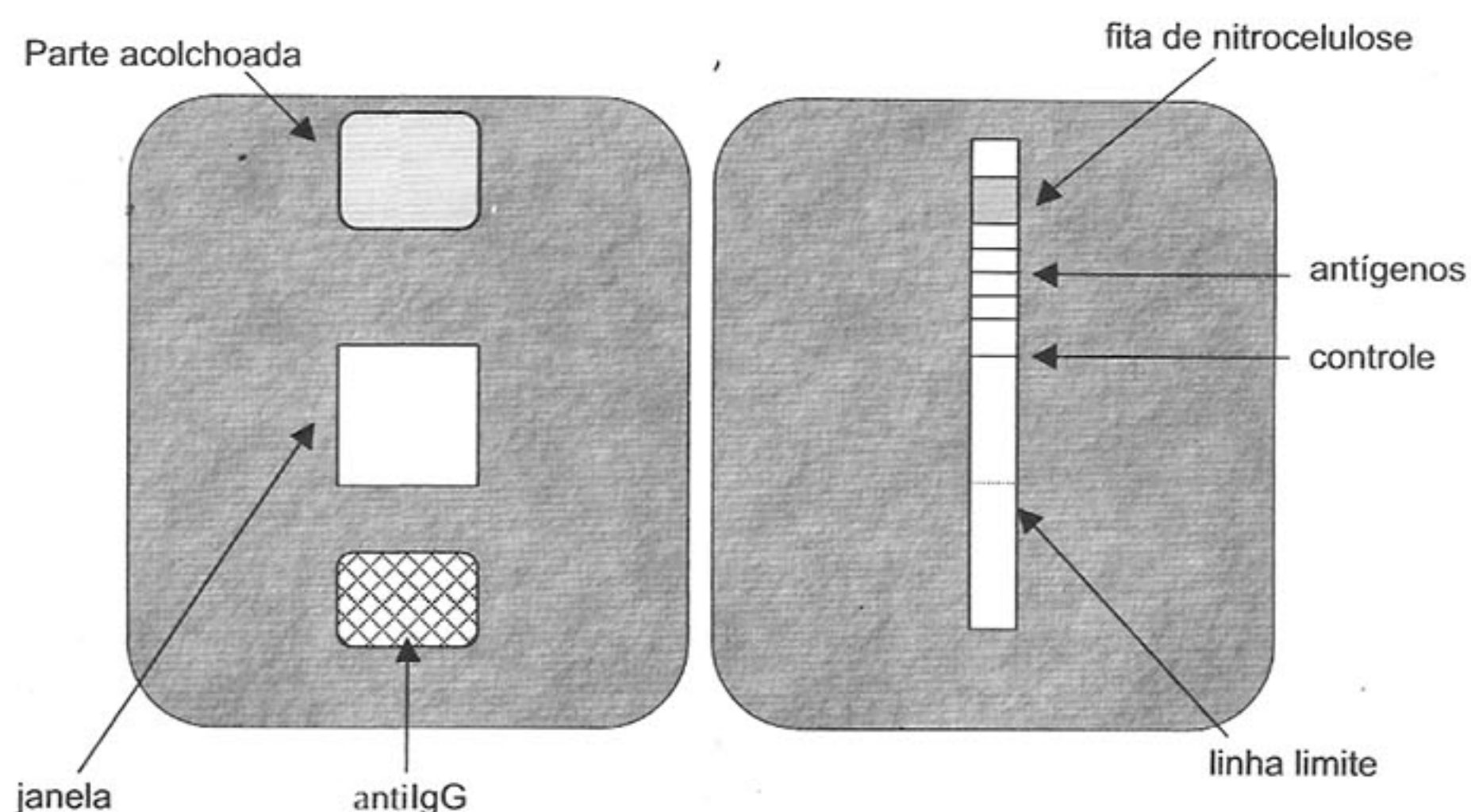


Tabela 1 - Distribuição dos grupos e dados demográficos

Grupo	N	IdadeM (± DP)	Gênero M/F	Cor B/NB
TB pulmonar	69	39,14 ± 14,81 (a)	39/30	24/25
Diagnóstico bacteriológico	63	39,08 ± 15,29	37/26	23/24
Evolução < 1 ano	29	40,2 ± 18,3	18/11	9/8
BAAR -/cultura +	8	39,6 ± 21,6	5/3	2/1
BAAR +/cultura +	21	40,4 ± 17,6	13/8	7/7
Evolução > 1 ano	34	39,8 ± 12,0	19/15	14/17
BAAR -/cultura +	15	38,2 ± 10,2	8/7	9/4
BAAR +/cultura +	19	38,0 ± 13,7	11/8	5/13
Diagnóstico clínico	6	39,8 ± 9,0	2/4	1/1
Assintomáticos	146	26,4 ± 11,9 (b)	53/93	77/69
Sem contato com TB	107	22,3 ± 4,0	39/68	57/50
Contatos de TB	39	37,8 ± 17,9	14/25	20/19
Seqüela de TB	12	52,7 ± 11,4 (c)	8/4	3/7
Outras doenças	41	45,4 ± 15,3 (d)	20/21	9/4
Respiratórias	31	48,1 ± 15,4	13/18	9/4
Câncer de pulmão	11	58,7 ± 12,8	3/8	3/2
Infecção resp. inespec	20	42,5 ± 13,9	10/10	6/2

TB= tuberculose; M (± DP) = média (± desvio padrão); M/F= masculino/feminino; TTC negativo= teste tuberculínico cutâneo com induração cutânea ≤ 9 mm; TTC positivo= teste tuberculínico cutâneo com induração cutânea ≥ 10 mm; B/NB=branco/não branco; BAAR= bacilo álcool-ácido resistente; infecção resp. inespec=infecção respiratória inespecífica (não tuberculosa)
 Teste ANOVA/Bonferroni: a versus (vs) b (p < 0,001); a vs c (p = 0,007); a vs d (p = 0,9)

uma sensibilidade de 65% (26/40), superior a obtida entre os casos cuja baciloscopia foi negativa 38 % (11/29) (p=0,04). O tempo de adoecimento não se relacionou de forma significativa com o resultado do

Tabela 2 - Resultados do teste ICT para o diagnóstico de tuberculose pulmonar

Tipo de soro	Número total de casos (N)	Sorologia ICT positiva(N)
TB pulmonar	69	37
TB diag. bacteriológico (a)	63	36
TB < 1 ano (b)	29	14
BAAR negativo (c)	8	3
BAAR positivo (d)	21	11
TB > 1 ano (b')	34	22
BAAR negativo (c')	15	7
BAAR positivo (d')	19	15
TB diagnóstico clínico (a')	6	1
Controle saudável	107	9
Saudável/TTC negativo	91	6
Saudável/TTC positivo	16	3
Contato domiciliar de TB	39	5
Contato TB/TTC negativo	24	4
Contato TB/TTC positivo	15	1
Seqüela de TB	12	6
Outras doenças respiratórias	31	8

TB= tuberculose; BAAR= bacilo álcool-ácido resistente; TB diag bacteriológico= tuberculose com diagnóstico confirmado por cultura; TB diag clínico= tuberculose com diagnóstico confirmado por prova terapêutica; ICT= imunocromatografia; pos/neg=teste positivo/teste negativo; TTC = teste tuberculínico cutâneo
 Teste do qui-quadrado: a versus (vs) a' (p = 0,06); b vs b' (p=0,2); c vs c' (p = 0,5); c vs d (p=0,3); d vs d' (p=0,4) c' vs d' (p=0,05)

teste sorológico (p=0,2). Não houve relação entre o resultado do TTC, história de vacinação por BCG na infância e o resultado da sorologia por ICT. Quando consideramos o resultado do teste ICT-TB entre os 112 pacientes sintomáticos respiratórios (69 com TB pulmonar e 43 sem TB pulmonar), que são aqueles em que o teste estaria indicado em condições operacionais reais, a especificidade alcança 67% (29/43).

Discussão

No presente estudo, a sensibilidade de 54% obtida com a sorologia por ICT foi inferior à obtida em experimento realizado no mesmo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ, com uma versão do mesmo kit ICT- AMRAC que utilizava cinco antígenos ao invés dos quatro da versão utilizada neste experimento.⁽¹⁰⁾ No entanto, a especificidade de 100 % entre os soros dos controles saudáveis do trabalho de Perkins e colaboradores diminuiu para 92 % no estudo atual.⁽¹⁰⁾ Quando são incluídos os soros de controles com outras doenças, a especificidade se mantém semelhante nos dois estudos, em torno de 85%. A exemplo do experimento de Perkins e cols., a sensibilidade foi significativamente maior (p=0,04) entre os pacientes com TB cuja pesquisa de BAAR no escarro foi positiva (65%) do que entre os pacientes em que ela foi negativa (38%) (Tabela 2). Este achado confirma descrições anteriores de que o antígeno 38-kDa reage

mais freqüentemente no soro de pacientes com TB e pesquisa de BAAR no escarro positiva. ^(11,12,13,14) Por outro lado, a sensibilidade da sorologia por ICT não foi significativamente maior nos pacientes com TB pulmonar há mais de um ano do que nos pacientes com TB há menos de um ano ($p=0,2$), mesmo quando estes resultados foram estratificados pelo resultado da pesquisa de BAAR no escarro. Este achado sugere que o tempo de adoecimento não teve influência na sensibilidade da sorologia utilizando esta metodologia, diferentemente do que sugeriu Mathur e cols. ⁽¹⁵⁾

A sensibilidade e a especificidade da sorologia pelo ICT no presente estudo foram inferiores aos resultados descritos anteriormente na China. ^(12,13) Estes autores utilizaram uma versão do teste ICT que continha somente o antígeno 38kDa e encontraram uma sensibilidade de 80% e 78%, e uma especificidade de 93% e 92 %, respectivamente. Já Mathur e cols., na Califórnia, mostraram uma sensibilidade do teste por ICT de apenas 20%, embora mantivessem uma razoável especificidade (89%) em 59 casos de TB pulmonar com cultura de escarro positiva para *M.tb.* ⁽¹⁵⁾ Os diferentes resultados entre os vários trabalhos podem ser interpretados de várias formas. Os trabalhos de Cole e cols. e Zhou e cols. utilizaram um número maior de pacientes com TB do que de controles saudáveis e/ou com outras doenças enquanto Mathur e cols. incluíram apenas 3 controles saudáveis na sua amostra. ^(12,13,15) Estas diferenças nas seleções dos grupos estudadas podem dificultar a comparação dos resultados. No entanto, mesmo com diferentes grupos, é surpreendente que um teste sorológico utilizando quatro antígenos, entre eles o 38kDa, tenha uma sensibilidade tão baixa (54%), sobretudo em uma população com alta prevalência de TB. Pesquisadores usando outras técnicas que não a ICT, como por exemplo a técnica de ELISA, têm obtido sensibilidades de 64 % a 89% com o antígeno 38kDa. ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾ Além disto, já foi demonstrado que a utilização de mais de um antígeno purificado de forma simultânea aumenta a sensibilidade dos testes sorológicos ^(7,8) Desta forma, era esperado que o teste do atual experimento obtivesse uma sensibilidade maior do que a encontrada. Uma possível explicação para esta baixa sensibilidade com o teste por ICT poderia estar mais relacionada à própria técnica utilizada do que à falta de reatividade aos antígenos empregados. Outra explicação seria a presença de fatores relacionados às características próprias da população estudada. Já foi descrito que variações na resposta específica aos antígenos micobacterianos em diferentes populações,

ligadas ao fenótipo HLA-DR, podem levar os testes sorológicos a mostrar significativas variações de sensibilidade em diferentes áreas geográficas. ^(20, 21) No entanto, parece que a titulação sérica de anticorpos contra o antígeno 38kDa não é afetada por variações geográficas. ⁽²¹⁾ Uma forma de verificação da influência da técnica e das características da população estudada na sensibilidade do teste sorológico seria submeter a mesma população a dois testes sorológicos utilizando o mesmo antígeno 38 kDa, porém com técnicas diferentes como, por exemplo, a ICT e a ELISA.

Um grupo habitualmente pouco avaliado é o dos pacientes com seqüela de TB pulmonar. Nenhum dos trabalhos publicados sobre a sorologia por ICT incluiu estes indivíduos na sua avaliação. No estudo atual, a sorologia por ICT forneceu resultados falso positivos em 50% (6/12) dos casos de seqüela de TB.

O presente estudo tem algumas limitações. A primeira é que os testes sorológicos foram realizados retrospectivamente, usando soro armazenado e congelado a - 20°C. Embora nenhum soro tenha sido descongelado mais de uma vez e nenhuma das amostras tenha permanecido mais de 28 meses congelada, pode ser que a utilização de soro fresco tenha algum impacto na sensibilidade do teste. Uma segunda limitação do estudo é a não inclusão do soro de pacientes com conhecida infecção por micobactéria não tuberculosa. A semelhança de antígenos testados com antígenos de outras micobactérias pode resultar em impacto na especificidade do teste. Existe a sugestão de um estudo *in vitro* de que anticorpos que se ligam ao antígeno 38kDa podem apresentar reação cruzada com antígenos do *M. malmoense* e do *M. intracellulare*, embora ainda não exista evidência clínica deste achado. ⁽²²⁾ Outra limitação é a utilização de indivíduos de um mesmo local, o que restringe a aplicação dos dados obtidos em outros locais. Também a forma de inclusão dos pacientes cujo soro viria a ser estudado é uma limitação do estudo. As amostras não foram incluídas de forma aleatória durante um período determinado de tempo. Embora isto tenha ocorrido com os pacientes provenientes das enfermarias e do ambulatório do HUCFF/UFRJ, alguns grupos como os casos de TB há mais de um ano e os controles assintomáticos foram selecionados para participar do estudo. Parece, entretanto, que os grupos simulam de forma razoável a situação epidemiológica do Rio de Janeiro.

A nossa conclusão é que a sensibilidade e a especificidade do teste sorológico ICT-TB conferiu a ele pouco valor para o diagnóstico de tuberculose pulmonar na nossa amostra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione M. Global burden of tuberculosis. Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* 1999; 282 (7):677-86.
2. Ruffino Netto A. Controle da tuberculose no Brasil. Atividades implementadas em 1999. *Boletim de Pneumologia Sanitária* 1999; 7(2): 58-66.
3. Soares ECC, Oliveira MFM, Dias SMO, Pio JE, Oliveira JR, Lauria LM, Durovni B, Cavalcante SC. Situação epidemiológica da tuberculose no município do Rio de Janeiro. *Pulmão RJ* 2002; 11(2):51-56.
4. Laszlo A. Tuberculosis: 7. Laboratory aspects of diagnosis. *CMAJ* 1999; 160 (12): 1725-9.
5. Daniel TM, Debanne SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135: 1137-51.
6. Engval E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III: quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 1972; 109:129-35.
7. Amicosante M, Houde M, Guaraldi G, Saltini C. Sensitivity and specificity of a multi-antigen ELISA test for the serological diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3(8): 736-40.
8. Harrington J, Ho J, Lapa e Silva JR, Conde MB, Kritski AL, Fonseca L, Saad MHL. Rapid tuberculosis diagnosis using a multi-antigen based enzyme-immunoassay for free and complex-dissociated antibodies. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4 (2): 161-7.
9. Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, Michael PH, Sheppard D, Hadley WK, Hopewell PH. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1985; 133: 515-8.
10. Perkins M, Conde MB, Martins M, Kritski AL. Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay. *Chest* 2003; 123 (1): 107-112.
11. Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun* 1998; 66 (8): 3936-40.
12. Cole RA, Lu HM, Shi YZ, Wang J, De-Hua T, Zhou AT. Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic assay based on the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* on patients with pulmonary tuberculosis in China. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77:363-8.
13. 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 Diag Lab Immunol* 1996; 77: 363-8.
14. Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38 (6): 2227-31.
15. Mathur ML, LoBue PA, Cantarazo. Evaluation of a serologic test for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3 (8): 732-5.
16. Jackett PS, Bothamley GH, Batra HV, Mistry A, Young DB, Ivanyi J. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1988; 26 (11): 2313-8.
17. Verbon A, Weverling GJ, Kuijper S, Speelman P, Jansen HM, Kolk AHJ. 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.
18. Bothamley GH, Rudd RM. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur Respir J* 1994; 7: 240-6.
19. Chiang I-H, Suo J, Bai KJ, Lin TP, Luh KT, Yu CJ, Yang PC. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 906-11.
20. Bothamley GH, Schreuder GMT. Human leukocyte antigen, tuberculosis, and *Mycobacterium tuberculosis*-specific antibody. *J Infect Dis* 1992; 165:598.
21. Bothamley GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995; 8 (supplement): S676-S 688.
22. Freeman R, Magee J, Barratt A, Wheeler J, Steward M, Maureen L, Piggott N. 1999. Rapid immunochromatographic assay for diagnostics of tuberculosis: antibodies detected may not be specific. *J Clin Microbiol* 37(6):2111-2. ■