

TÜBERKÜLOZ TEŞHİSİNDE YENİ LABORATUVAR METODLARI VE ELISA TESTİNİN DEĞERİ (The Value of New Laboratory Methods and ELISA in the Diagnosis of Tuberculosis)

Dr. Ahmet SANIÇ, Dr. Bülent BAYSAL, Dr. A.Zeki ŞENGİL

S.Ü.T.F.Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İnsanlık tarihi kadar eski bir geçmişe sahip olan tüberküloz, teşhis ve tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen 30 milyonluk prevalansı, 10 milyon yeni olgusu ve 3 milyon ölüm insidansı ile bütün dünyada, özellikle gelişmekte olan ülkelerin insanlarında önemli bir enfeksiyon hastalığı olarak karşımıza çıkmaktadır. 1960'lı yıllara göre büyük ölçüde azalmasına rağmen ülkemizde de başta gelen sağlık sorunlarından biri tüberkülozdur (1,2,3,4).

Tüberküloz hastalığının teşhisi klinik, radyolojik, bakteriyolojik, histolojik bulgular ve tüberkülin testi ile konulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü kesin tanımlamanın etkenin izolasyonu ile mümkün olacağını bildirmektedir (5,6,7,8,9). Ancak klasik kültür metodlarının çok zaman alması, direk mikroskopi ile teşhis için numunede 10.000'den fazla basil gerekmesi, tüberkülin testinin hastalık durumuyla geçirilmiş enfeksiyonu ayırt edememesi, klinik ve radyolojik bulguların her zaman tipik olmaması teşhiste yeni yöntemlere ihtiyaç göstermiştir (2, 3, 8, 10, 11,12,13,14,15).

Son yıllarda muayene maddesinden doğrudan doğruya tüberküloz basilini, nükleik asidini, basile ait ürünlerin yanında serum ve vücut sıvılarında basile karşı gelişen antikorlar araştırılarak tüberküloz teşhisine gidilebilmektedir.

TÜBERKÜLOZDA KULLANILAN YENİ TEŞHİS METODLARI:

A) Nükleik asit problemleri tüberküloz teşhisinde kullanılmakta olup, %90'ın üzerinde başarı sağlanmaktadır. Güvenilir bir ayırım için muayene maddesinde 10^6 basilin gerekmesi bildirilmiştir (14,16,17,18,19).

Son yıllarda prob tekniklerinden faydalanılarak

DNA segmentlerinin in vitro büyütülmesi esasına dayanan çok duyarlı ve özgül bir yöntem olan "DNA polimeraz zincir reaksiyonu" geliştirilmiş olup, tüberküloz şüpheli numunede bir mikroorganizmanın dahi bulunması teşhis için yeterlidir (17,20,21).

B) Kromatografi yöntemleri: beyin omurilik sıvısı ve balgamda gaz kromatografisi ve kütle spektrofotometresiyle tüberküloz stearik asit aranmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (13,17).

C) Radyometrik kültür yöntemleri: Son zamanlarda geliştirilmiş olan radyometrik kültür yöntemiyle kültür sonuçları 1-2 haftada, antitüberküloz ilaçlara duyarlılıkları bir haftada araştırılabilmektedir. Karbon (C) işaretli palmitik asit içeren besiyerinde (Bactec Middlebrook 7H12) tüberküloz basillerini bu maddeyi metabolize etmesiyle şişede sıvı üzerinde serbest radyoaktif CO in tesbit edilmesi üremeyi işaret eder (8,17).

Bactec TB 460 sistemini tüberküloz etkenlerini diğer saprofit mikobakterilerden ayırmaya yarayan radyometrik yöntem olup, numunelerdeki mikroorganizma sayısına bağlı olarak 2-6 günde sonuç verir. P-nitroasetil-aminohidroksi-propiofenol (NAP) adı verilen kimyasal madde M. tuberculosis ve muhtemelen M. bovisin üremelerini inhibe ederken saprofit mikobakterilerin üzerine etkisi yoktur (8,17,22).

D) Tüberkülozda Seroloji Yöntemleri ve ELISA

Tüberküloz enfeksiyonu sunucunda türe özgü antijenlere ve ayrıca mikobakterilerde bulunan ortak grup antijenlerine karşı antikor meydana gelir. Uzun yıllardan beri bu antikorları tesbit edilebilecek seroloji metodları araştırılmıştır. Bununla beraber henüz güvenilir, günlük kullanıma girebilen seroloji me-

odları bulunamamıştır (2,8,14,23).

Tüberkülozun serolojik tanımına ait ilk çalışma R. Koch'un tüberküloz basilini keşfinden 16 yıl sonra 1898'de yayınlanan Arloing'a ait bir çalışma olduğu belirtilmektedir (2,8,14). Arloing aglutunasyon testini kullanmış olup, akciğer tüberkülozlu hastaların % 57'sinde pozitif sonuç almış, sağlıklı kontrol ve tüberküloz dışı hastalıklı şahıslardan elde edilen serumların % 11'inde yalancı pozitif reaksiyon göstermiştir (2). 1903'de Bordet ve Gengou tüberküloz basil ekstresini, 1906'da Wasserman ile Bruck old tüberkülini antijen olarak kullanarak deneyi tekrarlamışlardır. 1948'de Middlebrook ve Dubos indirekt hemaglutinasyon testinin spesifikliğini, yine aynı araştırmacılar aktif tüberküloz hastalarında hemaglutinasyon testinin değerini araştırmışlardır (2,24).

Daha sonraki yıllarda çeşitli araştırmacılar kaolin aglutunasyon testi jelde presipitasyon immünfloresan pasif fostatid hemaglutinasyon testlerini kullanmışlardır. 1975'li yıllardan sonra çalışmalar RIA ve ELISA yöntemleri üzerinde yoğunlaştırılmış

olup, 1975 yılında Nassau ve Parsons solid faz radioimmunosassay (RIA), 1976 yılında yine Nassau ve arkadaşları ilk kez tüberküloz hastalarında ELISA yöntemiyle spesifik antikor araştırmışlardır (2, 14, 25, 26, 27).

Araştırmalarda genellikle üç ayrı tip antijen kullanılmaktadır. Bunlar ham basil, PPD ve saflaştırılmış antijendir.

1- Ham basil antijeni: 1976 yılında tüberkülozun ELISA ile tanımında ilk çalışmayı Nassau ham bir antijen olan M. tuberculosis H 37 Rv kültür filtratını kullanmıştır (2,14,26,28). Daha sonra BCG (Bacillus Calmette Guarin) ve tüberküloz basilinin soniklenmesiyle elde edilen antijenler uygulamaya sokulmuştur. Levy ve ark (29) ve Lin ve ark (30) ayrıca bu antijenlerle bronş yıkama sıvısında özgül IgG antikorlarını araştırmıştır. Tablo 1'de ham basil antijeni ile yapılan çalışmalar özetlenmiştir.

2- PPD: PPD daha önce belirtildiği gibi nisbeten ham bir antijendir. Saflaştırılmasına rağmen önemli miktarda nonspesifik reaksiyon verebilen mikobakteri

Tablo 1. Ham Basil Antijenleri Kullanılan Tüberküloz ELISA Sonuçlarının Karşılaştırılması

Araştırmacı	Kullanılan Antijen	Tüberkülozlu		Kontrol Grubu		ELISA TESTİNDE		Diğer Özellikler
		Pozitif Vaka Sayısı	Negatif Vaka Sayısı	Pozitif Vaka Sayısı	Negatif Vaka Sayısı	Duyarlılık	Özgüllük	
Nassau (26)	TB filtratı	26	20	1	47	0.556	0.979	1/500 serum dilüs.
	TB filtratı	87	9	4	44	0.804	0.917	1/100 serum dilüs.
Benjamin (31)	TB filtratı	15	12	7	38	0.556	0.844	
Thongkajai (32)	TB filtratı	49	5	8	86	0.910	0.907	
Kiran (33)	TB ekstresi	47	3	1	29	0.940	0.967	
Jagannath (34)	TB soniklenmiş	35	36	12	75	0.493	0.867	
Saçılık (28)	TB soniklenmiş	35	5	2	22	0.880	0.920	
Grange (35)	BCG soniklenmiş	73	27	1	29	0.730	0.967	
Kardito (36)	BCG soniklenmiş	82	25	4	139	0.766	0.972	
Garcia (37)	BCG soniklenmiş	39	11	0	50	0.780	1.000	
Samual (38)	BCG soniklenmiş	37	3	0	20	0.925	1.000	
Grange (39)	BCG soniklenmiş	136	64	1	49	0.680	0.980	

polisakkaridlerini içerirse de diğer saflaştırılmış antijenlere göre daha kolay elde edildiğinden ELISA'da antijen olarak sık kullanılmaktadır (2,14,28). PPD ile yapılan çalışmaların özeti Tablo 2'de verilmiştir.

3- Saflaştırılmış antijenler: Saprofit mikobakteriler normal şahıslarda düşük de olsa antikor cevabı uyandırır. ELISA testinde saf olmayan antijenler kullanıldığında yalancı pozitif reaksiyonla karşılaşmaktadır. Bu olayın çevredeki saprofit mikobakterilerde mevcut olmayan antijenlerin kullanılmasıyla önlenileceği bildirilmiştir (2,14,28).

a) Antijen 5: Bu grupta en çok denenen antijen olup, M. tuberculosis H37Rv suşunun kültür süzüntüsünden immunabsorbent affinite kromatografisi yöntemiyle elde edilen iyi karakterize edilmiş bir protein antijendir. Antijen 5'in başlangıçta inanıldığı gibi sadece tüberküloz basiline spesifik olmadığı, azda olsa özgül olmayan epizotlarının bulunduğu gösterilmiştir (2,13, 28,31,47,48,49,50).

b) Antijen 6: M. tuberculosis H37Rv suşu kültür filtratından immunabsorbent affinite kromatografisiyle elde edilen homojen sitoplasmik bir proteindir. Avantajlı yönü liyofilize hale getirilip, depolanabilmesidir. Muayene maddesinin elde edilmesindeki zorluktan dolayı bakteriyolojinin pek başarılı olamadığı akciğer dışı tüberküloz vakalarının teşhisinde kullanılabileceği bildirilmektedir (2,28,51,52).

c) Antijen 60(A 60) : 1973'de Gueur ve arkadaşları tarafından termostabil özellikteki A 60 keşfedilmiş olup. 1981'de Harbo tüberküloz teşhisinde kullanılabileceğini göstermiştir. A 60 tüberküloz deri testinde kullanılan old tüberkülin ve PPD'de bulunan $10^6 - 10^7$ dalton ağırlığında hem hücresel hem de sıvısal cevap oluşturulabilen bir imünojenidir. Tüm mikobakterilerde saptanmış olup bunun yanında Nocardia ve Corynebacterium'ların bazı türlerinde bulunduğu gösterilmiştir. Bu antijenin büyük bir kısmı stoplazma içinde, az olan diğer kısmı hücre duvarında bulunmaktadır (11, 44,53,54,55,56,57,58,59). A 60 M. bovis BCG stoplazmasından hazırlanmaktadır. Anti- BCG antijenleri kullanarak yapılan iki yönlü immünelektroforezle tanımlanmakta, jel kromatografisi ve lectin affiniteli kromatografisi ile saflaştırılmaktadır. A 60'ın kompozisyon ve miktarı mikobakterilerin hayat siklusuyla değişmektedir (11,55,56,57).

d- SAG A.1SAG B.SAG C: Reggiardo ve ark (61) kromatografik yöntemlerle serolojik yönden aktif üç farklı glikolipid elde ettiler. En iyi cevabı serolojik yönünden aktif glikolipid A1'in (SAG A1) verdiğini bildirmişlerdir (60,61).

e-Turneer ve ark. (62) M. bovis BCG P32 saflaştırılmış antijeni kullanarak aktif tüberkülozlularda spesifik IgG, IgM ve IgA seviyelerini araştırmışlardır.

f- Monoklonal antikorlarla yapılan çalışmada spesiflik daha yüksek değıldir (Tablo 3).

Tablo 2. PPD Kullanılan Tüberküloz ELISA Sonuçlarının Karşılaştırılması

Araştırmacı	Kullanılan PPD, konsantrasyonu	Tüberkülozlu		Kontrol Grubu		ELISA TESTİNDE	
		Pozitif Vaka Sayısı	Negatif Vaka Sayısı	Pozitif Vaka Sayısı	Negatif Vaka Sayısı	Duyarlılık	Özgüllük
Kalish (40)	Parke Davis, 200µg/ml	11	7	4	115	0.631	0.966
Zeis (14)	Parke Davis, 200µg/ml	14	7	27	99	0.667	0.786
Tandon (42)	RT-23 1000µg/ml	45	21	1	24	0.682	0.960
Gupta (43)	RT-23, 1000µg/ml	49	17	1	24	0.742	0.960
Jagannath (44)	Connauht, 10µg/ml	31	4	10	77	0.437	0.885
Pan (45)	PPD, 10µg/ml	105	17	2	90	0.861	0.978
Kiran (33)	Weybridge, 10µg/ml	40	10	3	27	0.800	0.900
Koshino (46)	PPD, 100µg/ml	13	2	0	7	0.867	1.000
Balestrino (47)	PPD, 10µg/ml	24	38	15	76	0.721	0.835
Daniel (31)	PPD, 10 µ/ml	13	28	4	25	0.317	0.932
Saçılık (28)	PPD, 10µ/ml	35	5	2	22	0.880	0.920

Tablo3. Safılaştırılmış Antijenlerle Yapılan ELISA Sonuçlarının Karşılaştırılması

Araştırımcı	Kullanılan PPD, konsantrasyonu	Tüberkülozlu		Kontrol Grubu		ELISA TESTİNDE		Diğer Özellikler
		Pozitif Vaka Sayısı	Negatif Vaka Sayısı	Pozitif Vaka Sayısı	Negatif Vaka Sayısı	Duyarlılık	Özgüllük	
Benjamin (63)	Antijen 5	42	8			0.840		
	Antijen 5	17	8	7	78	0.680	0.918	
Balestrino (47)	Antijen 5	55	31	0	91	0.680	1.000	
Ma (50)	Antijen 5	73	11	0	30	0.890	1.000	
Daniel (13)	Antijen 5	20	21	1	58	0.480	0.983	(1/80 dilüsyon)
	Antijen 5	26	15	5	54	0.634	0.915	(1/40 dilüsyon)
Alde (10)	Antijen 5	18	3	0	19	0.857	1.000	(Çocuk hastalar)
Stroebe (52)	Antijen 6	15	1	0	21	0.938	1.000	
Reggiardo (60)	Sag A1	42	4	1	89	0.913	0.989	
	Sag B1	34	12	0	90	0.739	1.000	
	Sag C	26	20	2	88	0.565	0.978	
Reggiardo (61)	Sag A1	63	11	3	141	0.0851	0.979	
	Sag B1	39	35	0	144	0.578	1.000	
	Sag C	35	39	3	141	0.897	0.979	
Krambovitis(64)	Plazma Membran ant.	94	6	6	180	0.940	0.968	
Aksu (65)	Hücre Duvarı ant.	66	5	2	28	0.929	0.933	
Turner (62)	P 32	61	54	49	237	0.530	0.830	
Turner (66)	P 32	15	18	11	210	0.460	0.950	
Daniel (67)	monoklon (TB-C1)	191	86	142	1039	0.690	0.880	
Wilkins (68)	monoklon (TB 72)	28	5	2	88	0.849	0.976	(Basil(+))vakalar)
		19	8			0.704		(Basil(-))Vakalar)
		3	1			0.750		(Tüberk. menenjit)
Mattar (69)	A 60	49	8	3	47	0.860	0.720	
Turner (66)	A 60	53	62	4	212	0.460	0.983	
Baelden (11)	A 60	67	14	0	22	0.827	1.000	
				2	28		0.931	(KOAİ)
Maes (70)	A 60			0	51		1.000	(Huzur evi)
				2	65		0.970	(Kadınlarda)

Safılaştırılmış antijenlerle yapılan çalışmaların özeti Tablo 3'de verilmiştir.

Antijen olarak bütün BCG hücreleri de kullanılmıştır (71).

ELISA ile tüberküloza spesifik antikor arayarak

akciğer tüberkülozunun teşhisi yanında, Chawla ve ark (72) barsak tüberkülozunda ELISA ile % 92 vaka pozitif sonuç almışlardır. Strobel ve ark (13) A 6'yı kullanarak kemik- eklem tüberkülozunda % 94 pozitif sonuç elde ederken, Wilkins ve Ivanyi (68) TB 72 olarak kodlanmış monoklonal antikorlarla kemik

ve eklem tüberkülozunda % 70, tüberküloz menenjitte serumda % 75 oranında tüberküloza spesifik antikorla karşılaşmışlardır.

E) ELISA ile tüberküloza spesifik antikor arama dışında;

Kardinal ve ark. (14) RIA, Yanez ve ark. (73) ELISA ile balgamda tüberküloz antijeni tayin etmişlerdir. Ayrıca beyin-omirilik sıvısında çeşitli araştırmacılar ELISA, RIA yanında hemaglutinasyon ve lateks aglutinasyon yöntemleriyle tüberküloz antijeni aramışlar ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (3,74). Antijen arama teknikleri antikor aramaya göre daha zor ve pahalıdır (2,17,73,74).

F) Tüberküloz menenjitlilerde BOS'ta mikobakteri antijeni ve ona karşı gelişen antikordan başka (2,36,75,76) Zhen Lu ve ark (77) tüberküloz menenjitlilerde nitrosellüloz immunospot metoduyla anti BCG antikorları salgılayan hücrelerin sayımının ilk haftada teşhiste kullanılabileceğini göstermişlerdir. Antikorlar ise özellikle 2. haftadan sonra yükselmektedir. Bu yüzden bu yöntemin tüberküloz menenjitin erken teşhisinde önemli olduğu vurgulanmıştır.

Bu bilgilerin ışığı altında, ELISA ile tüberküloza spesifik antikor arama nispeten ucuz olması ve pahalı araç gereç ve donanım ihtiyacı göstermemesi nedeniyle ülkemiz şartlarında rutin uygulanabilecek bir yöntemdir.

KAYNAKLAR

1. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları. İzmir : Barış Yayınları, 1990 : 355-359.
2. Daniel T M. Debanne S M. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 1137-1151.
3. Daniel T M. Mycobacterial diseases. Tuberculosis, In: Wilson et al (eds) Harrisons principles of internal medicine. New York: Mc Graw-Hill, 1991 : 637-648.
4. Öger O. Tüberküloz epidemiyolojisi ve Türkiye'de tüberküloz durumu. Klinik Dergisi 1989; 2: 42-44.
5. Akkaynak S. Tüberküloz. Ankara: Ayyıldız Matbaası A.Ş., 1986.
6. Erk M. Dünyada ve ülkemizde tüberkülozun tanı ve tedavisinde geçirilen evrimler. Klinik Gelişim 1989; 2 : 558-564.
7. Prez R M D , Heim C R. Mycobacterium tuberculosis. In: Mandel G L , Douglas R G, Bennet J E eds. Principles and practice of infectious diseases. London: Churchill Livingstone, 1990 : 1877-1906.
8. Samastı M B. Tüberkülozda mikrobiyolojik tanı yöntemleri. Klinik Dergisi 1989; 2 : 6-9.
9. Unat E K. Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi. İstanbul : Tıp Yayınları, 1986 : 312-361.
10. Alde S L, Pinasco H M, Pelosi F R, Budani H F, Palma-Beltran O H, Gonzalez-Montaner L J. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an IgG antibody to mycobacterium tuberculosis Antigen 5 in the diagnosis of active tuberculosis in children. Am Rev Respir Dis 1989; 39: 748-751.
11. Baelden M C, Vanderelst B, Dieng M, Prignon J, Cocito C. Serological analysis of human tuberculosis by an ELISA with mycobacterial Antigen 60. Scand J Infect Dis 1989; 21 : 1-11.
12. Baysal B, Şengil A Z, Saniç A. 1985-88 yılları arasındaki tüberküloz şüpheli balgamların bakteriyolojik incelenmesi ve sonuçların değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 1990; 5 : 45-49.
13. Daniel T M: Debanne S M, Vander Kuyp F. Enzyme-linked immunosorbent assay using Mycobacterium tuberculosis Antigen 5 and PPD for the serodiagnosis of tuberculosis. Chest 1985; 88 : 388-392.
14. Daniel T M. Rapid diagnosis of tuberculosis : Laboratory techniques applicable in developing countries. Rev Infect Dis 1989; 11 (Supp 2) : 471-478.
15. Samuel A M, Ashtekar M D, Gonatsa R D. Significance of circulating immune complexes in pulmonary tuberculosis Clin Exp Immunol 1984; 58 : 317-320.
16. Musiel C E, Tice L S, Stockman L, Roberts G D. Identification of mycobacteria from culture by using the gen probe rapid diagnosis system for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis complex. Clin Microbiol 1988; 26 : 2120-2123.
17. Robert G D, Koneman E W, Kim Y K. Mycobacterium In: Ballows A ed. Manual of clinical microbiology. Washington: American Society for Microbiology, 1991 : 304-339.
18. Starke J R. Modern approach to the diagnosis and treatment of tuberculosis in children. Pediatrics Clinics of North America 1988; 35 : 441-445.
19. Töreci K, Berkiten R. Mikobakteri genetiğindeki yenilikler. Klinik Dergisi 1989; 2 : 10-14.
20. Brisson-Noel A, Lecossier D, Nassif X, Giequel B, Levy-Frebault V, Hance A J. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet 1989; 8671 : 1069-1071.

21. Sjöbring U, Mecklenburg M, Anderson A B, Miorne H. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1990; 28 : 2200.
22. Howard B J, Domato J J. *Mycobacteria*. In: Howard B J, ed. *Clinical and pathogenic microbiology*. St Louis: The C.V. Mosby Company, 1987 : 479-502.
23. Good R C. Serological methods for diagnosing tuberculosis. *Ann Inter Med* 1989; 110 : 97-99.
24. Lefford M J. Immune response to mycobacteria. In: Rose N R, Friedman H, Fahey J L, eds. *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington: American Society for Microbiology. 1986: 415-421.
25. Nassau E, Parsons E R. Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by solid phase radioimmunoassay. *J Immunol Method* 1975; 6 : 261-271.
26. Nassau E, Parsons E R, Johnson G D. Detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*, 1976; 57 : 67-70.
27. Winters W D, Cox R A. Serodiagnosis of tuberculosis by radioimmunoassay. *Am Rev Respir Dis* 1981; 124 : 582-585.
28. Saçılık S. Tüberküloz serolojisinde ELISA ve farklı mikobakteri antijenlerinin önemi. *Mikrobiyol Bült* 1990; 24 : 198-204.
29. Levy H, Wade A A, Feldman C, Rabson A R. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in bronchial washings and serum. *Chest* 1988; 93 : 762-766.
30. Lin C C, Lin F J, Wu J L, Kua H T, Huang W C, Ling C Y. A preliminary study for cellular, albumin and immunoglobulin components of bronchoalveolar lavage fluid in normal control pulmonary tuberculosis and malignant lung diseases. *Chung Hua Min Kua Wei Sheng Wu chi Mien I Hsueh Tsa Chih* 1988; 21 : 110-116.
31. Benjamin RB, Debanne SM, Ma Y, Daniel TM: Evaluation of mycobacterial antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1984; 18: 309-318.
32. Thongkrajai P, Lulitanon V, Chamman VC. Improved ELISA with immunoabsorbent purified mycobacterial antigen for serodiagnosis of tuberculosis. *J Med Microbiol* 1989; 30:101-104.
33. Kiran U, Shriniwas KR, Sharma A. Efficacy of three mycobacterial antigens in the serodiagnosis of tuberculosis. *Eur J Respir Dis* 1985; 66: 187-195.
34. Jagannath C, Sengupta DN, Bahadur P. Serology of tuberculosis. II. Measurement of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by a passive hemagglutination test in human tuberculosis. *Tubercle* 1983; 64: 201-210.
35. Grange J M- Gibson J, Batty A, Kardjito T. The specificity of the humoral immune response to soluble mycobacterial antigens in tuberculosis. *Tubercle* 1980; 61: 153.
36. Kardjito T, Handoyo I, Grange JM. Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods. 1. The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined by ELISA. *Tubercle* 1982; 63: 269-274.
37. Garcia- Ortigoza E, Gutierrez- Valazquez A. Diagnostico de la tuberculosis pulmonar cronica por el metodo de immuno-ensayo enzimatico (ELISA). *Rev Latinoam Microbiol* 1984;24: 193-204.
38. Samuel NM, Adiga RB. Detection of antibodies in sera of leprosy patients and contacts by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn J Leprosy*; 53:32-37.
39. Grange JM, Kardjito T. Serological test for tuberculosis: Can the problem low specificity be overcome? *Indian J Chest Dis* 1982;24: 108-117.
40. Kalish SB, Radin RC, Phair JP, Levitz D, Zeiss CR, Metzger E. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay technique in the differential diagnosis of active pulmonary tuberculosis in humans. *J Infect Dis* 1983; 147: 523-530.
41. Zeiss CR, Kalish SB, Erlich KS, Levitz D, Metzger E, Radin R, Phair JP. IgG antibody to purified protein derivative by enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 845-848.
42. Tandon A, Saxena RP, Saxena KC. Diagnostic potentialities of enzyme-linked immunosorbent assay in tuberculosis using purified tuberculin antigen. *Tubercle* 1980; 61:87-89.
43. Gupta AK, Jamil Z, Srivastava VK, Tandon A, Saxena KC. Antibodies to purified tuberculin (PPD) in pulmonary tuberculosis and their correlation with PPD skin sensitivity. *Ind J Med Res* 1983; 78: 484-488.
44. Cocito C, Vanlindan F. Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clin Exp. Immunol* 1986; 66: 262-272.
45. Pan X, Yang P, Weng X. Determination of anti - PPD antibody ELISA. *Chin J Tuber Respir Dis* 1983; 6: 68-70.
46. Koshino T, Nishioka S, Fujimura M. ELISA for IgG antibody purified protein derivative (PPD) of patients with pulmonary tuberculosis. *Kekkaku* 1984; 59: 621-624.
47. Balestrino EA, Daniel TM, De Latini O A, Ma Y, Scocozza JB. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull WHO* 1984; 62: 755-761.
48. Daniel TM, Good RC, Janicki BW. Immunoelectrophoresis of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens. *Am Rev Respir Dis*; 1975; 112: 639-644.