

¹건국대학교 의료원 충주병원 호흡기내과, ²울산대학교 의과대학 서울아산병원 호흡기내과
이정연¹, 심태선²

Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection using Ex-vivo interferon-gamma Assay

Jung Yeon Lee, M.D.¹, Tae Sun Shim, M.D.²

¹Division of Pulmonary Medicine, Department of Internal Medicine, Konkuk University Medical Center, Chungju Hospital,

²Division of Pulmonary & Critical Care Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center,

Until recently, the tuberculin skin test (TST) has been the only tool available for diagnosing a latent TB infection. However, the development of new diagnostic tools, using the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-specific early secreted antigenic target 6 (ESAT-6) and culture filtrate protein 10 (CFP-10) antigens, should improve the control of tuberculosis (TB) by allowing a more accurate identification of a latent TB infection (LTBI). Antigen-specific interferon-gamma (IFN- γ) assays have greater specificity in BCG-vaccinated individuals, and as less biased by nontuberculous mycobacterial infections. Many comparative studies have suggested that those assays have a higher specificity than the TST, and the sensitivity of these assays are expected to remarkably improved if more MTB-specific antigens can become available. Nevertheless, the major obstacle to the widespread use of these tests is the limited financial resources. Similar to other diagnostic tests, the predictive value of IFN- γ assays depends on the prevalence of a MTB infection in the population being tested. Therefore, prospective studies will be needed to establish the applicability of these new assays at multiple geographic locations among patients of different ethnicities, and to determine if the IFN- γ responses can indicate those with a high risk of progressing to active TB. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 60: 497-509)

Key words: Interferon-gamma assay, Tuberculin test, Tuberculosis, Latent tuberculosis infection.

1. 서 론

전 세계 인구의 3분의 1이 결핵균에 감염되어 있으며, 결핵이 발병하는 환자의 90% 이상이 이미 감염되어 있는 사람에서 발병한다는 자료는 활동성 결핵뿐만 아니라 잠복결핵 환자의 올바른 진단 및 치료도 결핵의 조절 및 근절에 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 그러나 잠복결핵 치료의 중요한 문제점 중 하나는 어떻게 잠복결핵 환자를 올바르게 진단하는가이다. 전통적으로 투베르쿨린 검사(tuberculin skin test, 이하 TST)가 잠복결핵의 유일한 진단법이었으

나 TST는 비씨지 접종 또는 비결핵 항산균 감염과 결핵 감염을 명확히 구분하지 못하여 특이도가 떨어지고, 특히 잠복결핵의 치료의 적응증이 되는 면역억제 환자에서는 무반응(anergy)으로 인하여 민감도가 떨어져 유용성에 제한점이 있다. 최근 말초혈액을 이용한 체외 인터페론감마 검사(ex-vivo IFN- γ assay, 이하 IFN- γ 검사)가 기존의 TST보다 잠복결핵의 진단에 더 우수하다는 보고가 있어 왔고, 일부 검사는 이미 상업화 되어 시판중이다. 이 검사들은 결핵균-특이 항원을 이용하므로 실제 결핵균 감염과 비씨지 접종에 의한 TST 위 양성을 구별할 수 있을 것으로 기대되므로 국내처럼 대다수의 젊은 사람이 비씨지 접종을 받은 환경에서는 이 검사가 특히 유용할 가능성이 있다. 이에 결핵 면역기전에서의 IFN- γ 의 역할을 잠시 언급하고, 후반부에는 체외 IFN- γ 검사를 이용한 잠복결핵의 진단에 관한 문헌들을 고찰해 보고자 한다.

Address for correspondence: **Tae Sun Shim, MD.**

Address: Division of Pulmonary & Critical Care Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, 388-1 Pungnap-Dong, Songpa-Ku, Seoul, 138-736, South Korea
Phone: 02-3010-3892
Fax: 02-3010-6968
E-mail: shimts@amc.seoul.kr

2. 결핵에 대한 세포면역에서 IFN- γ 의 역할

결핵균에 대한 면역기전은 주로 세포매개성 면역, 특히 Th1 면역이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Th1 면역기전을 간단히 살펴보면 가지세포(dendritic cell)나 대식세포와 같은 항원제시세포(antigen-presenting cell)가 결핵균을 탐식한 후 IL-12를 분비하여 T 림프구를 자극한다. 결핵균 항원에 감작된 T 림프구는 IFN- γ 를 분비하고 분비된 IFN- γ 는 결핵균을 포식하고 있는 대식세포를 자극한다. 자극된 대식세포는 반응성 산소기(reactive oxygen species) 또는 반응성 질소기(reactive nitrogen intermediate) 등의 생성을 통하여 결핵균을 사멸 시키게 된다. 한편 결핵균을 탐식한 대식세포 및 T 림프구는 TNF- α 를 분비하여 T 림프구를 자극하고 또한 동시에 대식세포를 자극한다. 이러한 방어기전에서 IFN- γ 가 가장 중추적인 역할을 한다. 결핵에서 IFN- γ 의 역할은 IFN- γ knock-out 마우스 연구를 통하여 잘 알려져 있고¹, 사람에서도 IFN- γ 또는 IL-12 경로의 장애가 있는 사람에서 중증 마이코박테리아증이 발병한 보고들이 있어서 IFN- γ 가 결핵에 대한 방어기전에서 가장 중요한 역할을 하는 사이토카인 임은 잘 알려져 있는 사실이다².

3. 활동성 결핵의 진단 및 치료에서 IFN- γ 의 역할

결핵의 진단에서 IFN- γ 와 관련하여 가장 많은 연구가 되어 있는 것은 결핵성 흉수에서 흉수 IFN- γ 의 측정이다. 결핵성 흉수의 경우 균이 음성인 경우가 많아 다른 보조진단 방법들에 많이 의존하게 된다. 림프구-우세성 흉수에서 흉수 adenosine deaminase (ADA)의 측정이 결핵성과 악성 흉수의 감별에 유용하게 사용되고 있는데 흉수 IFN- γ 농도 측정은 ADA와 비교하여 비슷하거나 높은 진단율을 보여주고 있다³⁻⁵. 그 외에도 결핵성 심낭염, 결핵성 복막염 등의 진단에도 IFN- γ 의 측정이 유용한 것으로 보고되고 있으며^{6,7} 기관지폐포세척액 혹은 객담 내의 IFN- γ 측정을 통해 폐결핵의 중증도 및 치료 반응을 평가할

수 있는 지표로도 사용될 수 있는 것으로 보고되고 있다^{8,9}.

치료면에서는 다제내성 결핵에서 IFN- γ 를 항결핵 치료의 보조제로 사용한 여러 보고가 있었으나 아직 그 효과는 증명되지 않았다¹⁰⁻¹³. 국내에서도 3편의 연구보고가 있었으나 극히 제한된 환자에서만 효과를 보여주어 면역기전의 장애가 확인되지 않은 일반적인 중증, 진행성 다제내성 결핵환자에서 보편적으로 효과가 있을지는 미지수이다. 한편 분무용 IFN- γ -b1 (Actimmune[®])을 생산한 InterMune이라는 제약회사에서 2000년에 다제내성 결핵 환자를 대상으로 다기관 3상 연구를 시작하였으나 성공적인 결과를 얻지 못한 상태로 연구를 종료하였다.

4. 체외 IFN- γ 검사를 이용한 결핵감염의 진단

1) 투베르쿨린 검사

TST와 IFN- γ 검사는 결핵균 항원에 대한 세포면역 반응을 평가한다는 면에서는 비슷하지만 면역반응의 다른 관점을 보는 검사이다¹⁴. 이는 IFN- γ 유전자 knock-out 마우스에서도 purified protein derivatives (이하 PPD)에 의한 지연과민반응은 발생하나 IFN- γ 는 생성되지 않는다는 점에서 알 수 있다. TST에 사용되는 PPD는 결핵균 배양 상청액의 침전물로 약 200개 이상의 항원을 포함하는데 이 중 일부는 여러 비결핵 항산균에도 포함되어 있기 때문에 결핵균에 비특이적이다. 또한 검사를 위하여 PPD를 반복 주사하는 것 자체가 booster 반응을 야기하여 위 양성 결과를 초래함으로써 특이도가 낮아지는 원인이 된다¹⁵. 한편 활동성 결핵환자에서는 약 75-90%, 미만성 결핵에서는 약 50% 이하의 민감도를 보인다고 보고되고 있음에도 불구하고¹⁵ TST를 기반으로 하여 잠복 결핵을 치료한 결과 활동성 결핵의 발병을 약 60% 정도 줄였다는 보고가 있었으며¹⁶ 비용이 적게 들고, 특별한 검사장비 없이 쉽게 시행할 수 있는 장점 등으로 인해 현재까지도 TST를 잠복결핵의 진단에 이용하고 있는 것이 현실이다.

2) 체외 IFN- γ 검사

IFN- γ 검사는 말초혈액을 채취하여 결핵균 항원으로 자극한 후 결핵균 항원을 인지할 수 있는 T 림프구에 의한 IFN- γ 생성능을 확인하는 검사이다. 즉, IFN- γ 가 생성되면 체내에 결핵균 항원을 인지할 수 있는 T 림프구가 있으므로 결핵균에 감염되었음을 의미한다. 처음에 개발된 QuantiFERON[®]-TB (Cellestis limited, Carnegie Victoria, Australia; 이하 QFT)검사는 결핵균에 비특이적인 PPD를 항원으로 사용하였지만 비씨지 접종에 의한 위양성을 구분하기에 더 용이하다는 결과가 보고되면서 2001년에 미국 식품의약품안전청(Food & Drug Administration; FDA)으로 부터 잠복결핵의 진단 목적으로 허가를 받았다. 이후 PPD 대신에 결핵균특이 항원인 ESAT-6 (early secreted antigenic target 6) 와 CFP-10 (culture filtrate protein 10)을 사용한 2세대 검사인 QuantiFERON[®]-TB Gold (Cellestis limited, Carnegie Victoria, Australia; 이하 QFT-G) 가 개발되어 2005년 미국 FDA로 부터 결핵감염의 진단 목적으로 승인을 받았다. 또한, 미국 CDC (Centers for Disease Control) 에서는 결핵감염의 진단에 TST를 대체하여 사용할 수 있다고 기술하고 있다¹⁷⁻¹⁹. QFT-G의 또 다른 형태인 3 세대 검사 QuantiFERON[®]-TB Gold In Tube (이하; QFT-IT)는 ESAT-6와 CFP-10 항원 외에도 TB7.7(p4) 펩타이드 항원이 추가된 합성 펩타이드를 이용한 검사로써 소량의 검체(약 2ml)로도 진단이 가능하고 활동성 결핵환자에서 QFT-G에 비해 특이항원에 대한 IFN- γ 의 반응이 강하게 나타나는 것으로 알려져 있어 민감도가 높을 것으로 기대되고 있으며, 소아환자 및 특이항원에 대한 반응 정도가 약한 면역억제환자에서 좀 더 유용할 가능성이 있다²⁰. 이외에 유럽에서는 ESAT-6와 CFP-10 항원을 사용하는 T SPOT-TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK; 이하 T SPOT) 검사가 개발되어 잠복결핵 진단의 목적으로 승인을 받았다. 위 검사 방법들의 주된 장점은 결핵균-특이 항원을 사용하므로 비씨지 접종이나 비결핵 항산균 감염에 의한 위 양성을 줄여 특이도를 높일 수 있다는 점이다. 민감도에 대한 보고는

다양하나 기존의 TST에 비하여 민감도도 더 높을 것으로 기대되고 있다(특히 면역억제 환자에서도 민감도가 높은 것으로 보고되고 있다)²¹. 지금까지 잠복결핵을 대상으로 한 대부분의 연구에서는 TST 결과와의 일치도가 약 60-80% 로 보고되고 있다²²⁻²⁴.

이 검사들의 다른 장점으로는 판독자에 의한 판독 오류의 가능성이 적고, 환자가 한 번만 병원을 방문하여 채혈하면 되며, 반복된 PPD 주사로 인한 booster 효과가 없다는 점 등이다. 그렇지만 아직은 TST에 비하여 고가의 비용이 필요하고, 다양한 역학 상황에서도 동일하게 적용될 수 있을 지가 미지수이고, 이 검사에 의하여 결핵균 감염으로 판명된 사람이 실제로 향후 결핵이 발병할 확률이 높은지 등은 추후 임상경과를 지켜보아야 할 것이다. 또한 TST와 마찬가지로 결핵감염의 위험도(risk-stratified)에 따라 판정 기준치(cutoff value)도 차등화해야 한다는 주장도 제기되고 있다¹⁹.

(1) QuantiFERON[®]-TB Gold 검사

전혈(whole blood)을 이용한 IFN- γ 검사법은 1990년 Wood 등에 의하여 소 결핵의 진단을 위하여 처음으로 개발되었으며²⁵, 이후 인간에서도 유사한 검사법이 개발되어 QuantiFERON[®]-TB (QFT)라는 이름으로 상품화 되었다²⁶. 이 검사는 전혈을 이용하며 자극 항원으로 PPD를 사용하고, 16-24 시간 배양한 후 상청액에 분비된 IFN- γ 를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)법으로 측정하는 검사이다. Mazurek 등은 이 검사를 이용하여 1,226명의 결핵감염의 위험인자가 있거나, 활동성 결핵이 있거나 의심되는 환자를 대상으로 한 연구에서 TST와의 일치율이 83.1%임을 보였고, 특히 비씨지 접종 군에서 TST 양성/QFT 음성일 가능성이 7배나 높음을 보여서 이 검사가 비씨지 접종에 의한 결핵감염 진단의 위양성을 줄일 수 있는 것으로 보고하였다¹⁴. 그러나 결핵환자에서는 TST가 QFT에 비해 높은 양성률(민감도)을 보였기 때문에 미국 CDC는 QFT 검사를 잠복결핵의 진단 목적으로만 사용을 제한하였고, 활동성 결핵이 의심되는 경우에는 과거와 같이 TST를 시행할 것을 권고하였다²⁷. 반면에 Fietta 등은 활동성 결핵환자에

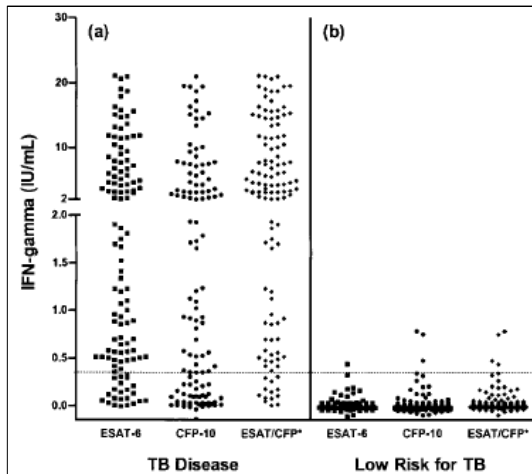


Figure 1. Dot plot of individual responses to CFP-10* and ESAT-6† for 118 culture-positive patients with TB (a) and 213 subjects with a low risk for TB‡ exposure (b) using QFT-G§ kit. The dashed line represents the cutoff of 0.35 IU/ml for IFN- γ . The specificity of the test for the low-risk group was 98.1% and the sensitivity for patients with *M. tuberculosis* infection was 89.0%¹⁷. Adopted from reference 17.

*early secretory antigenic target 6, † culture filtrate protein 10, ‡ tuberculosis, §QuantIFERON-TB Gold

서 QFT 검사가 TST보다 민감도가 높음을 보고하였는데 그 이유로 고령, 간경화 등의 기저질환을 가진 환자들이 많이 포함되었기 때문으로 분석하였고, 따라서 QFT 검사가 면역기능이 저하된 환자에서는 결핵감염을 진단하는데 TST보다 더 유용할 가능성을 제시하였다²⁸. 그렇지만 이 연구에서 결핵감염의 고위험군 중 비씨지 접종한 군에서 QFT 검사가 TST보다 높은 양성률을 보여 비씨지 접종의 영향을 배제하지 못했을 가능성이 제시되었다²⁸. 이후 Johnson 등은 TST 음성인 학생들을 대상으로 비씨지 접종 전과 비씨지 접종 5개월 후에 TST, QFT 검사 및 결핵균-특이 항원을 이용한 체외 IFN- γ 검사를 시행하였는데 양성 전환율이 각각 13%, 20%, 0%로 보고되어²⁹, QFT 검사는 비씨지 접종의 영향을 받을 뿐만 아니라 결핵감염의 진단에 있어서 TST 보다 우수하지 못함을 보고하여 결핵균에 특이적인 항원을 이용한 검사법의 개발이 필요하게 되었다.

QuantIFERON[®]-TB Gold (QFT-G)는 QFT 검사의 단점을 보완하기 위하여 BCG나 대부분의 다른 마

이코박테리아에는 존재하지 않고(*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens*, *M. marinum*는 예외) 결핵균에만 존재하는 RD1 (region of difference 1) 유전자 분절 부위에서 생성되는 ESAT-6와 CFP-10 항원을 사용하였다^{21,30}. 216명의 비씨지를 접종 받은 결핵감염의 위험도가 낮은 일본인을 대상으로 한 Mori 등의 연구결과 98.1%의 높은 특이도를 보여주었으며, 118명의 배양양성 결핵환자를 대상으로 한 QFT-G 검사의 민감도는 TST와 비교하여 유의하게 높은 것으로 (89% vs. 65.8%, 각각, Fig. 1) 보고되었다¹⁷. 전염성 결핵환자 접촉자 연구에서도 TST와의 높은 일치율을 보여주었고, 비씨지 접종을 한 군과 하지 않은 군에서 비슷한 양성률을 보여 비씨지 접종에 영향 받지 않음을 간접적으로 보여주었다¹⁸. 이 연구에서는 또한 QFT-G와 QFT 검사를 비교하여 전자는 비씨지 접종에 영향을 받지 않는 반면에 후자는 비씨지 접종의 영향을 받음을 보여주었다¹⁸. 국내인을 대상으로 한 연구에서도 결핵감염의 위험도가 증가함에 따라 검사 양성률 확률이 TST의 경우 1.52배 증가하는데 비하여 QFT-G는 5.31배 증가하는 것으로 보고되어 BCG 접종률이 높은 국내에서도 QFT-G가 결핵감염의 진단에 유용할 가능성을 보여주었다³¹.

그러나 Ferrara 등은 QFT-G가 면역억제환자를 대상으로 한 경우에는 양성, 음성의 판정이 불가능한 “indeterminate result”가 많이 관찰됨을 보고하여 이 검사의 단점으로 지적되었다³². “Indeterminate result”는 양성대조군 항원(phytohemagglutinin)에도 충분히 자극되지 않았거나 음성대조군에 기저 IFN- γ 분비가 많은 경우를 의미한다¹⁷. Brock 등도 HIV양성 환자를 대상으로 잠복결핵의 선별검사에 QFT-IT검사를 시행하였는데 중증의 면역억제(CD4 세포 < 100/uL)인 경우 그렇지 않은 경우에 비해 “indeterminate result”가 유의하게 높음(24% vs. 2.8%, $p < 0.05$)을 보고하여 QFT-IT 역시 면역억제 정도에 따라 검사의 유용성에 제한이 있을 가능성이 있음을 제시하였다³³.

결핵의 유병률이 높은 남아프리카 지역에서 358명의 건강한 성인을 대상으로 QFT, QFT-G, QFT-IT 검사를 비교한 연구 결과 양성률은 각각 215 (60%), 137 (38%), 201 (56%) 명이었으며 각 검사간 일치도

또한 낮게($\kappa = 0.12-0.50$) 나타나 같은 ELISA 방법을 사용하더라도 각 세대간 검사 특징 및 유병률에 따라 결과에 큰 차이가 있음을 제시하였으며, 특히 QFT-G, QFT-IT의 일치도가 낮게 나타나 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다³⁴.

(2) T SPOT-TB 검사(Fig. 2)

QFT-G는 분비된 IFN- γ 의 농도를 ELISA 방법으로 측정하는데 비하여 T SPOT-TB 검사(T SPOT)는 ELISPOT (enzyme-linked immunospot analysis) 기법을 이용하며, 항원의 자극에 의하여 IFN- γ 가 분비되면 바닥에 고정되어 있는 IFN- γ 항체와 결합하게 되며 T 림프구 주위로 분비되어 IFN- γ 항체와 결합하므로 염색 후에는 한 개의 점으로 보이게 되는데 이를 spot-forming cell count (SFC)이라고 한다³⁰. 많은 보고들은 상업화 된 T SPOT을 이용한 것이 아니나 같은 항원을 사용하였고, 같은 ELISPOT 법을 이용하였으므로 T SPOT 검사를 사용한 것에 준하여 기술한다.

대부분의 ELISPOT을 이용한 연구는 재조합 항원

보다는 15mer의 펩타이드의 조합(peptide pool)을 항원으로 사용하였다^{21,30,35}. 보고에 따라 펩타이드나 재조합 항원 사이에 차이가 없기도 하였고^{30,36}, 펩타이드는 항원 특이 T 림프구를 검출한 반면에 재조합 항원은 T 림프구 검출에 실패한 결과를 보고하기도 하였다³⁷. 아마도 이는 재조합 ESAT-6 항원이 외부에서 주어진 경우 MHC class I 항원제시 경로를 통하여 항원이 제시되지 못하기 때문인 것으로 생각되었다^{21,38}.

Lalvani 등은 ESAT-6 펩타이드 만을 항원으로 사용하여 ELISPOT 법으로 92% (43/47)의 특이도 및 배양양성 결핵환자에서 96% (45/47)의 민감도를 보여 주었다³⁵. ESAT-6 및 ESAT-6/CFP-10을 이용한 ELISPOT 연구에서도 전염성 결핵환자와의 접촉의 강도 및 노출 기간과 ELISPOT 검사간에 강한 상관관계를 보여주었다^{39,40}. 이 후 결핵 유병률이 높은 건강 인도인(BCG 접종 여부 모름)과 유병률이 낮은 건강 영국인(82.5%가 비씨지 접종)을 대상으로 ESAT-6/CFP-10을 이용한 ELISPOT 검사 연구에서 양성률이 각각 80% (80/100), 0% (0/40)로 역학상황과 잘 일

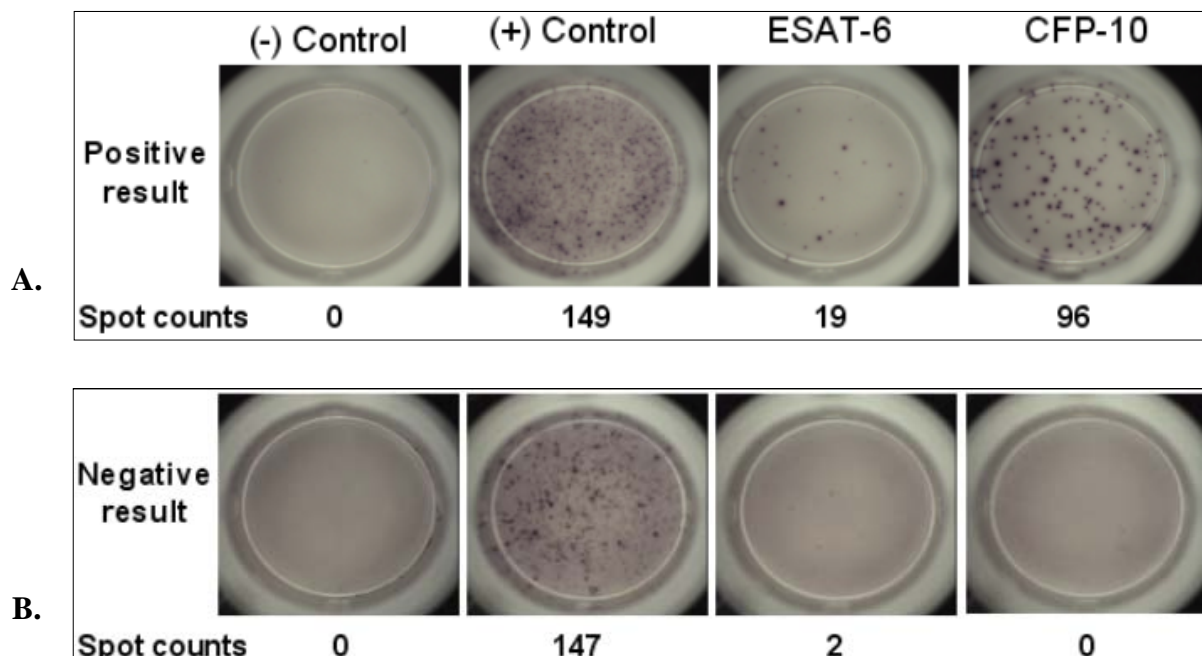


Figure 2. Representative positive (A) and negative (B) results of T SPOT-TB analysis. The positive result (A) shows many spots in the ESAT-6* or CFP-10† stimulated wells, whereas the negative result (B) shows less than 5 spots in the ESAT-6 or CFP-10 stimulated wells.

*early secretory antigenic target 6, † culture filtrate protein 10

치하였으며³⁰, TST와 PPD를 이용한 ELISPOT 검사 결과는 양 군에서 차이가 없어서 ESAT-6/CFP-10을 이용한 ELISPOT 검사는 비씨지 접촉의 영향을 배제하고 실제 잠복결핵을 진단할 수 있는 유용한 방법으로 평가되었다³⁰. 반면에 결핵의 유병률이 높은 잠비아인을 대상으로 한 연구에서는 낮은 민감도가 문제점으로 제기되었는데 이는 기준치(cutoff value)의 설정이 기존의 연구와 차이가 있었기 때문일 가능성이 있어서 향후 다양한 역학 상황에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다²². 최근에는 Shams등이 413명의 건강접촉자를 대상으로 전향적인 연구에서 접촉 계수(contact score)의 증가에 따른 검사 양성률이 TST보다 ELISPOT 검사에서 유의하게 높음을 보여주었으며, 특히 미국에서 출생한 경우나 비씨지 접촉을 하지 않은 경우 이러한 차이가 더욱 유의하게 나타남을 보여주어 검사결과의 해석에 있어서 각 지역의 비씨지 접촉률이나 결핵의 유병률 또한 중요하게 작용함을 알 수 있었다⁴¹. Richeldi 등은 단기간(평균 6시간) 다제내성 결핵 환자에 노출된 92명의 건강인을 대상으로 TST, PPD, 혹은 RD1 펩타이드를 이용한 ELISPOT 검사를 시행하여 그 결과를 비교하였는데 TST와 달리 ELISPOT 검사는 환자에서의 노출 정도와 높은 상관성을 보여주어 RD1 ELISPOT 검사가 단기간의 접촉에 의한 결핵감염을 진단하는데 있어서도 유용함을 보여주었다⁴². 접촉자 92명 중 1명은 면역억제제를 사용중인 환자로 활동성 결핵이 증명되었는데 이 환자에서 TST는 음성이었으나 RD1 ELISPOT 검사는 양성으로 결핵의 진단을 가능하게 하였다.

면역억제 환자, 특히 HIV (human immunodeficiency virus) 감염 환자에서도 CD4 T 림프구 감소에 따라 면역반응이 떨어질 것이라는 예상과는 달리 ESAT-6 항원에 대한 반응이 좋은 것으로 보고되었고³⁰, Chapman 등도 HIV 양성이 ESAT-6와 CFP-10 펩타이드를 이용한 ELISPOT 검사의 민감도를 떨어뜨리지만 그 정도가 PPD를 이용한 ELISPOT 검사나 TST보다 훨씬 적음을 보고하였다²¹. 따라서, TST는 HIV 양성 환자 또는 면역억제제를 사용하는 환자처럼 잠복결핵의 진단 및 치료가 중요한 환자에서 민감

도가 낮은 단점이 있으나^{15,43} T SPOT 검사는 이런 단점을 해결해 줄 수 있을 것으로 기대되고 있다. 한 연구에 의하면 T SPOT는 면역억제 환자에서도 “indeterminate result” 결과가 많지 않은 것(<5%)으로 보고되었으며⁴⁴, 최근 혈액암 환자를 대상으로 한 접촉자 연구에서도 T SPOT-TB 검사가 TST에 비해 양성률이 높았고, “indeterminate result” 역시 낮게(4.3%) 나타나 면역억제 상태에서도 T SPOT 검사가 잠복결핵의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 제시하였다⁴⁵.

(3) QuantiFERON-TB Gold 와 T SPOT-TB 검사법의 비교

양 검사법의 차이는 Table 1과 같다. T SPOT은 말초혈액에서 단핵구를 따로 분리하고 세포 수를 측정하여야 하므로 전혈을 사용하는 QFT-G에 비하여 시간과 비용이 더 많이 드는 단점이 있지만 반면에 혈청에 이미 분비되어 있던 IFN- γ 의 영향을 배제할 수 있는 장점이 있다. 또한 배양 후의 실험 과정은 오히려 T SPOT이 더 간단하다고 할 수 있다. QFT-G는 ELISA법을 이용하고 ELISA 판독기는 실험실에서 흔히 사용되고 있으므로 설치에 큰 부담이 없을 수 있으나 T SPOT은 SFC의 수를 측정하기 위하여 고가의 ELISPOT 판독장비를 필요로 한다. 그러나 고가의 ELISPOT 판독기 대신 현미경이나 확대경을 사용할 수 도 있다. 또한 QFT-G는 96 well plate가 8 well strip들로 나누어져 있어서 소수의 검체를 검

Table 1. Comparison between QuantiFERON-TB Gold and T SPOT-TB tests.

	QuantiFERON-TB Gold	T SPOT-TB
Material (well)	Whole blood (1 ml)	Mononuclear cells (2.5x10 ⁵)
Stimulants	ESAT-6*/CFP-10† peptides	ESAT-6/CFP-10 peptides
Methods	ELISA§	ELISPOT
Incubation time	Less than 24 hours	Less than 24 hours
Equipments	ELISA reader	ELISPOT reader

*early secretory antigenic target 6, † culture filtrate protein 10, ‡ tuberculosis, §enzyme-linked immunosorbent assay, || enzyme-linked immunospot assay

사할 때 편리한 장점이 있지만 매 검사마다 표준농도를 구하기 위하여 8-well이 추가로 필요하므로 소수의 검체를 검사할 때는 많은 well이 소모되는 단점이 있다. 반면에 T SPOT-TB는 표준농도를 구하기 위한 well이 필요 없고 각 검체 당 4개의 well만 사용하면 된다. 한 개의 plate를 1주 내에 여러 번 반복하여 배양하더라도 결과에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있으므로 소수의 검체 씩 여러 번 반복하여 사용하는 것도 가능하다. 최근 T SPOT도 96 well이 strip으로 나누어져 여러 번 나누어 검사하는데 편리하도록 제조되고 있다.

ELISA와 ELISPOT 검사법을 비교한 자료들을 살펴보면, Scholvinck 등⁴⁶은 ESAT-6와 CFP-10 항원을 이용한 결과를 비교하였는데 ELISPOT 법은 T SPOT에서 사용하는 펩타이드 대신 항원 단백질을 사용하였으며, ELISA법은 QFT-G와 달리 72시간 배양하는 방법을 사용하여 양 검사법의 정확한 비교라고 하기는 어렵다. 이 연구에서 활동성 결핵환자 13명에서 ELISPOT 법은 100%, ELISA 법은 92.3%의 민감도를 보였고, 잠복결핵 환자에서는 각각 87%, 91%의 민감도를 보여 양 검사결과는 높은 일치도를 보였다. Goletti 등도 활동성 결핵환자를 대상으로 한 연구에서 ELISPOT 및 선택된 RD1 펩타이드를 사용한 ELISA법과 QFT-G를 비교하였고 각 검사의 민감도는 74%, 81%, 89%, 각 검사의 특이도는 93%, 90% 68%를 나타내어 선택된 RD1 펩타이드를 사용한 ELISA법이 상업화 된 kit를 이용한 QFT-G에 비해 민감도에는 큰 차이가 없으면서 특이도가 높음을 보여주었다⁴⁷.

그러나, QFT-G의 경우 잠복결핵을 포함한 결핵 감염의 진단에 사용할 수 있도록 cutoff 값을 설정한 것에 비해 Goletti 등의 연구에서는 선택된 RD1 펩타이드를 사용한 ELISA법에서는 활동성결핵을 진단하기에 가장 적절한 cutoff값을 이용하여 민감도 및 특이도를 구하였으므로 cutoff의 차이에 의하여 QFT-G의 특이도가 낮게 나왔을 가능성을 언급하고 있다⁴⁷. 본 연구자의 경험에 의하면 활동성 결핵환자를 대상으로 하여 ROC (receiver operator characteristic) curve 분석을 통해 계산된 cutoff를 이용하여 민감도

및 특이도를 구해보면 기존의 cutoff 수치에 비해 QFT-G와 T SPOT 검사간의 일치도가 향상되는 것을 관찰할 수 있었다⁴⁸. 이러한 현상이 물론 검사법 자체에 의한 차이일 수도 있으나 한편으로는 TST 결과 판독 때와 마찬가지로 환자의 면역상태나 각 지역의 결핵의 유병률 등에 따라 cutoff 값의 조정이 필요할 가능성을 제시하여 준다. 그러나, 이를 임상에 적용하기 위해서는 다수의 환자를 대상으로 한 대규모 전향적 연구가 필요할 것이다.

최근 QFT-G 검사와 T SPOT 검사를 직접 비교한 보고 자료를 살펴보면, 본 저자의 연구에서는 T SPOT 검사(95.4%)가 TST (66.7%)나 QFT-G (70.1%)에 비해 높은 민감도를, QFT-G (91.6%)가 TST (78.6%)에 비해 높은 특이도를 나타내었고, 주로 면역억제자에서 QFT-G 및 T SPOT 검사간의 민감도 차이가 큰 것을 알 수 있었다⁴⁸. Ferrara 등은 잠복결핵이나 활동성 결핵이 의심되는 환자를 대상으로 두 검사를 임상에서 시행한 자료를 비교 하였는데, T SPOT 검사가 QFT-G에 비해 민감도가 높고 “indeterminate result”의 비율은 낮은 것으로 보고하였다⁴⁹. 그러나 잠복결핵의 확진 방법이 아직은 없기 때문에 이러한 결과가 T SPOT의 민감도가 높아서인지 혹은 특이도가 낮아서인지 추가 확인이 필요하다.

(4) 치료 후 추적검사로 IFN- γ 검사의 유용성

Stuart 등은 활동성 결핵 및 잠복결핵 환자를 대상으로 각각 12개월 간의 병합치료 및 isoniazid 예방치료를 시행하였으나 QFT 검사 결과에 차이가 없었고⁵⁰, 또 다른 QFT 연구에서도 1개월 간의 항결핵 치료는 QFT 결과에 영향을 미치지 않았다²⁸. 그러나 ESAT-6 또는 ESAT-6/CFP-10을 이용한 ELISPOT 연구에서는 항결핵 치료 후 IFN- γ 를 분비하는 T 림프구의 수가 감소함을 보여주었다^{30,36}. Carrara 등도 ESAT-6 펩타이드를 이용한 ELISPOT 연구에서 항결핵 치료 3개월 시점에 세균학적 및 임상적 호전을 보이는 환자에서는 IFN- γ 를 분비하는 T 림프구의 수가 감소하였고 반응이 없는 환자에서는 감소하지 않아 치료에 대한 반응을 평가하는데 유용할 가능성을 제시하였다⁵¹. 반면에 이 연구에서도 PPD를 이용

한 ELISPOT 검사는 치료 3개월 시점에 일관되지 않은 반응을 나타내었다⁵¹. 최근 불가리아인을 대상으로 한 연구에서도 비록 대상환자 수는 적었으나 37.5% (3/8) 의 환자에서 치료 후 양성에서 음성으로 전환됨을 보고하기도 하였다⁵². 한편, Aiken등이 잠비아인을 대상으로 한 연구에서는 T SPOT 검사를 이용하여 6개월간의 항결핵 치료를 완료한 환자(총 82명)의 대부분은 치료 전에 비해 치료 12개월째 추적검사에서는 양성에서 음성으로 전환되거나 SFC가 감소됨을 보고하여⁵³ 치료반응의 평가에 이용가능 함을 제시하여 주었다(10 SFC를 cutoff 로 사용). QFT-G를 이용하여 치료의 반응을 평가한 보고는 아직 없으나 검사법을 개발한 Rothel 박사에게 의하면 QFT-G도 ESAT-6와 CFP-10에 대한 IFN- γ 반응이 치료 후에 감소한다고 하였다(개인 교신). 이는 일반적으로 알려진 사실, 즉 결핵 치료 초기에는 결핵 자체에 의한 면역기능 억제로 잠복결핵 환자보다 IFN- γ 분비능이 낮다가 치료하면서 면역기능이 회복되어 IFN- γ 분비능이 증가하는 현상, 과 모순되는 결과를 보여준다. 실제로 일부 연구에서는 항결핵 치료하면서 IFN- γ 분비가 증가하는 것을 보여주었다⁵⁴.

현재 상품화되어 있는 두 가지의 IFN- γ 검사법을 이용하였을 때 치료 후 IFN- γ 분비능이 감소할 것이라는 이론적인 근거는 두 가지 검사 모두 16-24시간의 배양기간을 원칙으로 하기 때문이다. 이 짧은 기간 동안에는 결핵균의 항원을 인지할 수 있는 효과세포(effector cell)가 있어야만 IFN- γ 를 분비할 수 있다고 생각하고 있다. 즉 결핵이 치료되면서 대부분의 결핵균이 사멸함에 따라 효과세포는 대부분 기억세포(memory cell)로 바뀌기 때문이다. 기억세포가 다시 결핵균 항원에 노출되면 효과세포로 바뀌어 IFN- γ 를 분비하게 되기 때문에 IFN- γ 를 분비하기 위해서는 16-24시간의 배양시간 보다는 더 오랜 시간이 필요하다. 효과세포의 존재는 최근 항원에 노출되어야만 지속적으로 유지될 것이므로⁵⁵ ELISPOT 양성은 체내에 살아있는 균이 존재함을, 즉 잠복결핵을 의미하고 과거에 결핵균에 노출되었던 것 만으로는 양성 반응을 보이지 못한다³⁰. 물론 체내에 살아있는 균이 없어도 가지세포(dendritic cell) 내에 있는 ESAT-6와

CFP-10 항원이 지속적으로 분비될 가능성도 고려할 수 있으나 항결핵 치료 후 항원 특이 T 림프구의 수가 급격히 감소하는 것으로 보아 항원 특이 T 림프구는 체내에 살아있는 결핵균의 존재에 의해서 유지될 가능성이 많다³⁰. 따라서 PPD와 같이 결핵균에 비특이적인 항원을 사용하였거나⁵⁶ 아니면 ESAT-6 같은 결핵균-특이 항원을 사용하였더라도 24시간 이상 장기간 배양하였으므로 다양한 결과를 나타낼 가능성이 있다^{54,57}. 반면 QFT-G나 T SPOT은 24시간 이내로 배양하므로 기억세포들이 IFN- γ 를 분비하기에는 시간이 부족하여 치료 후 결핵균 수가 줄어들면서 효과세포의 수가 감소하여 IFN- γ 반응이 줄어드는 것으로 생각된다^{58,59}. 결핵균 항원 특이 항체를 생성하는 B 세포도 치료에 따라 군배양 음전보다도 빠르게 감소하는 것으로 보고되었다⁶⁰.

그러나 이러한 이론적인 배경과 보고에도 불구하고 본 연구자의 경험으로는 결핵 환자의 치료 시 QFT-G는 치료종료 시 농도가 치료시작 시와 비교하여 변화가 없거나 오히려 증가하는 양상을 보이기도 하였다. T SPOT은 많은 예에서 SFC가 감소하는 양상을 보이기는 하였으나 완전히 음성으로 변하는 경우는 아주 적었다⁶¹. 향후 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

(5) 활동성 결핵의 진단 검사로서 IFN- γ 검사의 유용성

Pathan 등은 건강 접촉자, 폐외 결핵, 도말 음성 폐결핵 및 도말 양성 폐결핵균을 비교하였을 때 항원의 양은 순서대로 증가할 것이나 ESAT-6 특이 림프구의 수는 역상관계가 있음을 보여주었다³⁶. 이에 대한 설명으로는 이 T 림프구들이 체내에서 결핵균을 억제하는 역할을 하기 때문일 것으로 생각된다. 즉 T 림프구 반응이 강한 사람(건강 접촉자)은 결핵균의 성장을 잘 억제하여 건강 접촉자로 유지될 것이고, T 림프구의 반응이 약한 사람은 균 수가 증가하여 결핵(도말 양성 폐결핵)이 발병할 것이다³⁶. 그러나 아직까지 활동성 결핵과 잠복결핵을 구분하기 위한 IFN- γ 또는 SFC의 기준치(cutoff value)를 제시한 연구는 없었다.

이론적으로나 현재까지의 연구 결과를 토대로 하였을 때 체외 IFN- γ 검사가 활동성 결핵과 잠복결핵을 구분하는데 국내에서 이용되기는 어려울 것으로 보인다. 그러나 두 가지 가능성을 제시한다면 다음과 같다.

첫째, 결핵이 의심되는 임상상 또는 방사선학적 소견이 있는 면역적격자에서 체외 IFN- γ 검사가 음성이라면 결핵을 배제하는데 유용할 가능성이 있다. 이러한 목적으로 이용되기 위해서는 IFN- γ 검사의 민감도가 높아야만 한다. ESAT-6만을 이용한 Lalvani 등의 ELISPOT 연구에서는 민감도 96%³⁰, QFT-G를 이용한 Mori 등의 연구에서는 민감도 89%¹⁷를 보여주었지만 아직 체외 IFN- γ 검사와 TST 중 어느 방법이 결핵감염을 진단하는데 더 민감도가 높은 지에는 이견이 있는 상태이다. 향후 결핵균에 특이적인 항원들이 더 발견되어 이 항원들을 기존의 ESAT-6와 CFP-10에 포함시키면 민감도를 더 높일 가능성이 있다. 향후 이에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

둘째, 결핵감염의 위험성이 적은 군에서는 결핵감염의 진단 자체를 결핵진단의 보조도구로 사용할 수 있다. 예로 일반적으로 어린이는 결핵균에 감염되었을 가능성이 낮기 때문에 IFN- γ 검사로 결핵감염이 확인되면 결핵이 의심되는 병이 실제로 결핵일 가능성이 높아지게 된다. 또한 결핵의 유병률이 낮은 지역에서도 마찬가지이다. Liebeschuetz 등은 HIV와 결핵 감염률이 높은 아프리카에서 결핵이 의심되는 어린이를 대상으로 ELISPOT 검사법의 활동성 결핵 진단의 유용성을 평가하였다. ELISPOT 검사의 민감도는 83%로 TST의 민감도 63%보다 유의하게 높았고, 이러한 결과는 특히 어린이에서 결핵 진단이 어른에서 보다 어렵기 때문에 더 의미가 크다고 할 수 있겠다⁶². Ravn 등은 활동성 결핵이 의심되는 환자를 대상으로 하였을 때 QFT-G가 항산균 도말 검사에 비해 활동성 결핵을 진단하는데 더 민감도가 높고(85% vs. 42%, 각각) 특히 폐외결핵에서는 민감도가 각각 92%, 31%로 더 높아, 항산균 도말 및 배양검사와 QFT-G 검사를 병합하면 민감도를 96%까지 올릴 수 있다고 하였으나, 이 연구가 결핵감염률이 낮은 덴마크에서 이루어진 연구이기 때문에 가능했던 것으로

보인다⁶³. 예로 국내에서 이 검사가 시행된다면 성인 폐렴환자를 대상으로 하더라도 많은 환자가 이미 결핵균에 감염되어 있으므로 IFN- γ 검사에서 양성으로 나올 것으로 예측된다.

결핵은 감염의 각 단계에 따라 합성, 분비되는 항원이 달라지므로 이를 이용하여 활동성 결핵과 잠복결핵 혹은 최근 감염과 진구성 감염을 구분하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 그러나, 아직 결핵의 유병률이 높은 지역에서 결핵이 의심되는 성인을 대상으로 결핵진단의 목적으로 IFN- γ 검사를 시행한 결과는 보고된 바 없다.

6) 향후 전망

체외 IFN- γ 검사를 이용한 접촉자 연구에서 처음에는 ESAT-6³⁹만을 항원으로 사용하다가 이후 ESAT-6와 CFP-10을 같이 사용하였다⁴⁰. 이처럼 항원을 복합으로 사용하면 민감도를 높일 수 있는데^{23,64} 이는 개인마다 HLA-DR형이 다르므로 항원에 대한 반응이 다르기 때문인 것으로 알려져 있어²³ 향후 결핵균에 특이적인 항원의 추가적인 발견은 체외 IFN- γ 법의 민감도를 더욱 높여줄 수 있을 것으로 기대되고 있다^{65,66}.

최근 스위스에서 발표된 비용-효과 연구에 의하면 접촉자 추적검사에 TST를 이용하는 것에 비해 T SPOT만 사용하거나, TST와 T SPOT을 병합한 경우(TST양성 인 경우 T SPOT으로 확진)가 더 비용-효과적인 절감을 가져 왔다고 보고하였다. 이는 정확한 잠복결핵의 진단으로 인하여 불필요한 예방치료를 줄임으로써 효율의 상승을 가져온 것으로 분석되었다⁶⁷. 그러나 각 지역에 따라 잠복결핵 치료의 정책이 다르므로 이에 따라 비용-효과 분석 결과는 다를 것이다. 향후 이에 대한 연구들이 지속되리라 생각된다.

Doherty 등은 말초혈액의 단핵세포를 ESAT-6로 자극하여 5일간 배양 후 상청액의 IFN- γ 를 ELISA로 측정하고 결과 비록 대상 군 수는 적었지만 결핵환자 접촉자 중에서 IFN- γ 반응이 높았던 군에서 2년 추적검사 후 결핵의 발병률이 높아서 ESAT-6를 이용한 체외 IFN- γ 검사법이 결핵감염 뿐만 아니라 향후

발병할 위험군을 찾아내는 방법으로도 도움이 될 것으로 보고하였다⁶⁸. 향후 체외 IFN- γ 검사를 시행한 환자들을 장기간 추적하여 이 결과와 환자의 임상상의 관계를 밝히려는 노력 또한 필요할 것이다.

이 외에 상기에서 언급한 바와 같이 활동성 결핵 진단에의 유용성, 항결핵 치료 반응의 평가에서의 유용성, 면역억제자에서의 결핵감염 진단에서의 유용성에 대한 연구가 지속되리라 생각된다.

5. 결 론

최근 개발되어 상업화 된 체외 IFN- γ 검사들은 이론적으로나 지금까지의 연구 결과를 토대로 하여 볼 때 결핵감염의 진단에서 TST 보다 유용할 것으로 생각된다. 주된 장점은 비씨지 접종 또는 비결핵 항산균 감염에 의한 위양성을 줄일 수 있다는 점이지만 TST보다 민감도가 높을 가능성도 제시되고 있고, 새로운 결핵균-특이 항원들이 개발되어 기존의 항원들에 추가된다면 민감도는 더욱 높아질 가능성도 있다. 그러나 세계 각 지역마다 결핵의 역학 상황에 차이가 있으므로 각 상황에 맞는 적절한 사용이 필요할 것으로 생각되며, 아직은 비용이 제한점으로 작용할 가능성이 많다. 이와 관련된 향후 활동성 결핵 진단에서의 유용성, 치료반응 평가에 있어서의 유용성, 각 지역의 역학 또는 인종 등에 따른 기준치(cutoff value)의 설정의 차이 등 추가적인 분야들에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993;178:2243-7.
- Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996; 335:1941-9.
- Wongtim S, Silachamroon U, Ruxrungtham K, Udompanich V, Limthongkul S, Charoenlap P, et al. Interferon gamma for diagnosing tuberculous pleural effusions. *Thorax* 1999;54:921-4.
- Ogawa K, Koga H, Yang B, Fukuda M, Ohno H, Yamamoto Y, et al. Differential diagnosis of tuberculous pleurisy by the measurement of cytokine concentration in pleural effusion. *Kekkaku* 1996;71: 663-9.
- Barnes PF, Fong SJ, Brennan PJ, Twomey PE, Mazumder A, Modlin RL. Local production of tumor necrosis factor and IFN-gamma in tuberculous pleuritis. *J Immunol* 1990;145:149-54.
- Ribera E, Martinez Vasquez JM, Ocana I, Ruiz I, Jimenez JG, Encabo G, et al. Diagnostic value of ascites gamma interferon levels in tuberculous peritonitis: comparison with adenosine deaminase activity. *Tubercle* 1991;72:193-7.
- Burgess LJ, Reuter H, Carstens ME, Taljaard JJ, Doubell AF. The use of adenosine deaminase and interferon-gamma as diagnostic tools for tuberculous pericarditis. *Chest* 2002;122:900-5.
- Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Johnson JL, Ribeiro F, Palaci M, Sa RT, et al. Sputum cytokine levels in patients with pulmonary tuberculosis as early markers of mycobacterial clearance. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:818-23.
- Tsao TC, Huang CC, Chiou WK, Yang PY, Hsieh MJ, Tsao KC. Levels of interferon-gamma and interleukin-2 receptor-alpha for bronchoalveolar lavage fluid and serum were correlated with clinical grade and treatment of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:720-7.
- Koh WJ, Kwon OJ, Suh GY, Chung MP, Kim H, Lee NY, et al. Six-month therapy with aerosolized interferon-gamma for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *J Korean Med Sci* 2004;19: 167-71.
- Suarez-Mendez R, Garcia-Garcia I, Fernandez-Olivera N, Valdes-Quintana M, Milanes-Virelles MT, Carbonell D, et al. Adjuvant interferon gamma in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis: a pilot study. *BMC Infect Dis* 2004;4:44.
- Condos R, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis with interferon-gamma via aerosol. *Lancet* 1997;349:1513-5.
- Kim EK, Shim TS, Lee JY, Oh YM, Lim CM, Lee SD, et al. The adjuvant effect of subcutaneous interferon-gamma in the treatment of refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberc Respir Dis* 2004;57:226-33.
- Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL, Bernardo J, Lardizabal AA, Bishai WR, et al. Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin

- skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. JAMA 2001;286:1740-7.
15. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis 1993;17:968-75.
 16. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice: latent tuberculosis infection. N Engl J Med 2002;347:1860-6.
 17. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:59-64.
 18. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. Am J Respir Crit Care Med 2004;170:65-9.
 19. Mazurek GH, Jereb J, LoBue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. MMWR Recomm Rep 2005;54:49-55.
 20. Cellestis Ltd. QuantiFERON-TB Gold (In-Tube Method) package insert. Cat. no. 0599 0201. Victoria, Australia 2004.
 21. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, Pathan AA, Ewer K, Ayles H, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. AIDS 2002;16:2285-93.
 22. Hill PC, Brookes RH, Fox A, Fielding K, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D, et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in the Gambia. Clin Infect Dis 2004;38:966-73.
 23. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff TH, et al. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:1089-96.
 24. Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR Jr, Alexander LN, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:606-9.
 25. Wood PR, Corner LA, Plackett P. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. Res Vet Sci 1990;49:46-9.
 26. Desem N, Jones SL. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5:531-6.
 27. Mazurek GH, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. MMWR Recomm Rep 2003;52:15-8.
 28. Fietta A, Meloni F, Cascina A, Morosini M, Marena C, Troupioti P, 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;31:347-53.
 29. Johnson PD, Stuart RL, Grayson ML, Olden D, Clancy A, Ravn P, et al. Tuberculin-purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:934-7.
 30. Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis*-infection in healthy urban Indians. J Infect Dis 2001;183:469-77.
 31. Kang YA, Lee HW, Yoon HI, Cho B, Han SK, Shim YS, et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. JAMA 2005;293:2756-61.
 32. Ferrara G, Losi M, Meacci M, Meccugni B, Piro R, Roversi P, et al. Routine hospital use of a commercial whole blood interferon-gamma assay for tuberculosis infection. Am J Respir Crit Care Med 2005;172:631-5.
 33. Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, Westh H, Mathiesen LR, Ravn P. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. Tuberculosis* specific interferon gamma test. Respir Res 2006;7:56.
 34. Mahomed H, Hughes EJ, Hawkridge T, Minnies D, Simon E, Little F, et al. Comparison of mantoux skin test with three generations of a whole blood IFN-gamma assay for tuberculosis infection. Int J Tuberc Lung Dis 2006;10:310-6.
 35. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med

- 2001;163:824-8.
36. Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001;167:5217-25.
37. Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, Malin AS, Pathan AA, Andersen P, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:270-5.
38. Pathan AA, Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Latif M, McShane H, Pasvol G, et al. High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in *M. tuberculosis*-infected subjects without disease. *Eur J Immunol* 2000;30:2713-21.
39. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001;357:2017-21.
40. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361:1168-73.
41. Shams H, Weis SE, Klucar P, Lalvani A, Moonan PK, Pogoda JM, et al. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1161-8.
42. Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini BM, Roversi P, Deeks J, et al. T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:288-95.
43. 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:S221-47.
44. 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.
45. Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, Ferrarese M, Migliori GB, Barbarano L, et al. Use of a T-cell based test for detection of TB infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2006. (In press)
46. Scholvinck E, Wilkinson KA, Whelan AO, Martineau AR, Levin M, Wilkinson RJ. Gamma interferon-based immunodiagnosis of tuberculosis: comparison between whole-blood and enzyme-linked immunospot methods. *J Clin Microbiol* 2004;42:829-31.
47. Goletti D, Vincenti D, Carrara S, Butera O, Bizzoni F, Bernardini G, et al. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis: comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunospot assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1311-6.
48. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, et al. Comparison of two commercial interferon gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 2006. (In press)
49. Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Roversi P, Piro R, Meacci M, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 2006;367:1328-34.
50. Stuart RL, Olden D, Johnson PD, Forbes A, Bradley PM, Rothel JS, et al. Effect of anti-tuberculosis treatment on the tuberculin interferon-gamma response in tuberculin skin test (TST) positive health care workers and patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:555-61.
51. Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D. Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. *Clin Infect Dis* 2004;38:754-6.
52. Markova R, Drenska R, Terzieva V, Todorova Y, Dimitrov V, Nikolova M. The application of the T spot-TB assay in Bulgarian patients with tuberculosis infection. *Probl Infect Parasit Dis* 2005;33:10-11.
53. Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah DJ, Lugos MD, et al. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infect Dis* 2006;6:66.
54. Kim YS, Cho SA, Park MS, Chung JH, Hwang SY, Kim SK, et al. Change of Interferon gamma production in patients with active tuberculosis after treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;A376.
55. Zinkernagel RM, Bachmann MF, Kundig TM, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996;14:333-67.
56. Hengel RL, Allende MC, Dewar RL, Metcalf JA, Mican JM, Lane HC. Increasing CD4+ T cells specific for tuberculosis correlate with improved clinical immunity after highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:969-75.
57. Wu-Hsieh BA, Chen CK, Chang JH, Lai SY, Wu CH, Cheng WC, et al. Long-lived immune response to early secretory antigenic target 6 in individuals who had recovered from tuberculosis. *Clin Infect Dis*

- 2001;33:1336-40.
58. Hill PC, Fox A, Jeffries DJ, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Owiafe PK, et al. Quantitative T cell assay reflects infectious load of *Mycobacterium tuberculosis* in an endemic case contact model. Clin Infect Dis 2005;40:273-8.
59. Godkin AJ, Thomas HC, Openshaw PJ. Evolution of epitope-specific memory CD4(+) T cells after clearance of hepatitis C virus. J Immunol 2002;169:2210-4.
60. Sousa AO, Wagnier A, Poinignon Y, Simonney N, Gerber F, Lavergne F, et al. Kinetics of circulating antibodies, immune complex and specific antibody-secreting cells in tuberculosis patients during 6 months of antimicrobial therapy. Tuber Lung Dis 2000;80:27-33.
61. Park IN. Evaluation of the response to antituberculous treatment using ex-vivo interferon- gamma assay. Tuberc Respir Dis 2005;59:55.
62. Liebeschutz S, Bamber S, Ewer K, Deeks J, Pathan AA, Lalvani A. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. Lancet 2004;364:2196-203.
63. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, 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;12:491-6.
64. Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, Farrant L, Palmer N, Hewinson RG. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:571-8.
65. Liu XQ, Dosanjh D, Varia H, Ewer K, Cockle P, Pasvol G, et al. Evaluation of T-cell responses to novel RD1- and RD2-encoded *Mycobacterium tuberculosis* gene products for specific detection of human tuberculosis infection. Infect Immun 2004;72:2574-81.
66. Brock I, Weldingh K, Leyten EM, Arend SM, Ravn P, Andersen P. Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Clin Microbiol 2004;42:2379-87.
67. Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection. Eur Respir J 2006. (In press)
68. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, Wolday D, Britton S, Egualé T, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. J Clin Microbiol 2002;40:704-6.