

T limfocitų išskiriamo INF- γ vertinimas diagnozuojant tuberkuliozės infekciją

Dr. Edita Hansted¹, prof. habil. dr. Brigita Šitkauskienė²

¹ KMU Vaikų ligų klinika

² KMU Pulmonologijos ir imunologijos klinika

Reikšminiai žodžiai: tuberkuliozė, INF- γ , T limfocitai.

Santrauka. Tuberkuliozė – viena grėsmingiausių, plačiai pasaulyje paplitusių lėtinių infekcinių ligų, lemianti didelį mirtingumą. Dažniausiai taikomas metodas latentinei tuberkuliozės infekcijai nustatyti yra įodinis tuberkulino mėginys, kurio jautrumas nepakankamas, ypač BCG vakcina skiepytųjų populiacijoje. Siekiant efektyvesnės tuberkuliozės infekcijos diagnostikos, sukurti nauji *in vitro* diagnostiniai metodai, kurie pagrįsti *M. tuberculosis* sukkelto imuninio atsako ypatumų vertinimu, t. y. stimuliuotų T limfocitų išskiriamo gama interferono (INF- γ) nustatymu.

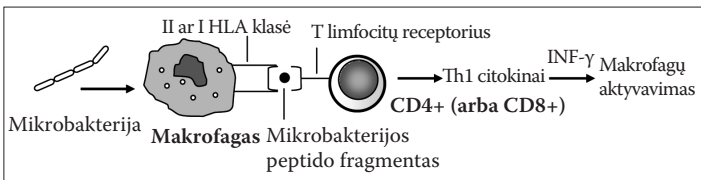
Tuberkuliozė – viena grėsmingiausių, plačiai pasaulyje paplitusių lėtinių infekcinių ligų, lemianti didelį mirtingumą. Nepavėluota jos diagnostika, tinkamas gydymas ir profilaktika tebėra vieni aktualiausių medicinos uždavinių siekiant sėkmingos tuberkuliozės kontrolės [1].

Tuberkuliozė – pasaulinė problema. Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, trečdalis pasaulio gyventojų yra užsikrėtę tuberkuliozės mikobakterijomis [1]. Apie 10 proc. užsikrėtusiųjų suserga tuberkulioze. Didžiausias sergamumas yra Afrikos ir Azijos žemynuose [2]. Nors Vakarų Europos šalyse pastaraisiais dešimtmečiais sergančiųjų tuberkulioze sumažėjo, 2004 m. PSO ataskaita rodo, kad iš Europos regione užregistruotų naujų tuberkuliozės atvejų net 80 proc. buvo nustatyti Nepriklausomų valstybių sąjungoje (NVS), Baltijos šalyse ir Rumunijoje [3].

PAPLITIMAS

Nepaisant visuotinės vakcinacijos *bacille Calmette-Guérin* (BCG) vakcina, Lietuvoje sergamumas tuberkulioze yra didelis: svyruoja nuo 60 iki 70 atvejų 100 tūkst. gyventojų [4, 5]. Statistikos duomenimis, Lietuvoje itin grėsmingas vaistams atsparios tuberkuliozės paplitimas – ji sudaro apie 9 proc. visų naujų tuberkuliozės atvejų [4, 5]. Manoma, kad tai sąlygoja gydymo režimo nesilaikymas, asocialus gyvenimo būdas, nereikalingai skiriama chemoprofilaktika antituberkulioziniais vaistais tuberkuliozės infekcijai gydyti [4, 6]. Žinoma, kad vaikai, ypač naujagimystės laikotarpiu, yra imlesni tuberkuliozei dėl imuninės sistemos ypatumų [1, 7].

Asmuo, turėjęs kontaktą su sergančiu aktyvia plaučių tuberkulioze žmogumi, dažniau užsikrečia šia infekcija ar suserga tuberkulioze [2]. Net šalyse,



1 pav. SPECIFINIS IMUNINIS ATSAKAS Į *M. TUBERCULOSIS* [36]

kur tuberkuliozės paplitimas mažas, 30–40 proc. naujai susirgusių žmonių užsikrečia *M. tuberculosis* nuo sergančių asmenų [3, 4, 8].

Siekiant efektyvesnės tuberkuliozės infekcijos diagnostikos, sukurti nauji *in vitro* diagnostiniai metodai, kurie pagrįsti *M. tuberculosis* sukkelto imuninio atsako ypatumų vertinimu, t. y. stimuliuotų T limfocitų išskiriamo gama interferono (IFN- γ) nustatymu.

TUBERKULIOZĖS PATOGENEZĖ

Jei organizmo imuninis atsakas į tuberkuliozės mikobakterijas yra nepakankamas, asmuo susergera tuberkulioze. Tačiau daugeliu atvejų tuberkuliozės mikobakterijos gali persituoti organizme ir ligos nesukelti.

Tuberkuliozės mikobakterijoms patekus į organizmą, sužadinas specifinio imuniteto aktyvumas, vyraujant ląsteliniam imunitetui [19]. Pagrindinės ląstelės, dalyvaujančios imuniniame atsake į tuberkuliozės infekciją, yra makrofagai ir T limfocitai, kurių citokinai, ypač IFN- γ [20], lemia lėtojo tipo hipererginę reakciją ir specifinės granulomos formavimąsi [14]. Kai granulomos centre sutrinka kraujotaka, vystosi distrofiniai pokyčiai, susiformuoja kazeozinė nekrozė, aplinkui susikaupę T limfocitai ir makrofagai sudaro pirminį židinį. Iš šio židinio virulentiškos mikobakterijos plinta krauju ar limfa į daugelį organizmo vietų [21]. Plintant dideliame kiekiui bakterijų, galimas diseminuotos tuberkuliozės išsivystymas. Jei išsiseja nedidelis kiekis bakterijų, jų sąlygojami pažeidimai sukelia ekstrapulmoninę tuberkuliozę, plaučių tuberkuliozės reaktyvaciją [14].

Tuberkuliozės patogenezės mechanizmas kol kas nevisiškai aiškus. Kiekvienas organizmas pasižymi individualiu jautrumu ir atsaku į tuberkuliozės mikobakteriją.

M. TUBERCULOSIS SUKELTAS IMUNINIS ATSAKAS

Ląstelinį imunitetą galima apibūdinti kaip organizmo imuninės sistemos atsaką, kai padidėja specifinių T limfocitų populiacija. Veikiami tuberkuliozės mikobakterijų antigenų išsiskiria citokinai (1 pav.), kurie pritraukia kraujo makrofagus į pažeidimo sritį ir juos

suaktyvina. IFN- γ ir alfa navikinis nekrozės faktorius (TNF- α) yra pagrindiniai makrofagų aktyvumą skatinantys citokinai.

Igyjamą ląstelinį atsparumą lemia lokalis suaktyvėjusių makrofagų populiacijos susidarymas [24–26]. Kuo jų daugiau susikaupia lokaliai, tuo stipresnis organizmo gebėjimas sunaikinti tuberkuliozės bakterijas [25, 26].

Žinoma, kad, pasireiškus tiek ląsteliniam imuniniam atsakui, tiek lėtojo tipo hipererginei reakcijai, bakterijų dauginimasis slopinamas vienodai veiksmingai [27, 28]. Vis dėlto, esant ląsteliniam imuniniam atsakui, bakterijos naikinamos aktyvinant makrofagus, o esant lėtojo tipo hipererginei reakcijai, naikinami bakterijų prisipildę nesuaktyvinti makrofagai ir aplinkiniai audiniai, taigi kartu ir viduląstelinė aplinka, kuri yra palanki bakterijoms daugintis [29, 30].

Pagrindinė ląstelinio imuniteto funkcija – suaktyvinti aplinkinius dar neaktyvius makrofagus [30–35]. Šie jau suaktyvėję perifokaliniai makrofagai fagocituoja ir naikina bakterijas, ištrūkusias iš kazeozinės nekrozės centro.

TUBERKULIOZĖS DIAGNOSTIKA IR JOS PROBLEMAS

Nuo 1890 metų ilgą laiką vienintelis ir dažniausiai taikomas metodas latentinei tuberkuliozės infekcijai nustatyti buvo įodinis tuberkulino mėginys – *Mantoux* mėginys (ITM), kurio jautrumas nepakankamas, ypač BCG vakcina skiepytųjų populiacijoje [9–11].

Po kontakto su *M. tuberculosis* suaktyvinti T limfocitai, *in vitro* paveikti šios mikobakterijos antigenų, t. y. anksti sekretuojamo antigeninio taikinio (angl. *early secreted antigenic target*, ESAT-6) ir kultūros filtrato baltymo (angl. *culture filtrate protein*, CFP-10), ima išskirti IFN- γ . Šiuo principu paremti nauji užsikrėtimo tuberkuliozės infekcija diagnostikos metodai jau įtraukti į kai kurių šalių tuberkuliozės diagnostikos algoritmus [11–13]. Pasitelkus naujus specifinius imuninius tyrimus, vertinančius tuberkuliozės sukkelto imuninio atsako ypatumus, būtų galima tiksliau ir greičiau aptikti tuberkuliozės infekciją [13–15]. T limfocitų, išskiriančių IFN- γ , nustatymu pagrįstų tyrimų rezultatams įtakos neturi buvęs skiepijimas BCG vakcina, o tai ypač aktualu vertinant užsikrėtimą tuberkulioze mūsų šalyje, kur vykdoma šimtaprocentinė naujagimių vakcinacija BCG vakcina [14–18].

Metodai tuberkuliozei diagnozuoti [13, 14, 21]

Anamnezės surinkimas labai aktualus tiriant vaikus, kad būtų išsiaiškintas kontaktas su užkrečiama tuberkulioze sergančiu asmeniu.

Tiksliausias diagnostikos metodas – skreplių ar kitos tiriamosios medžiagos pasėlis ir mikroskopija tuberkuliozės mikobakterijoms nustatyti. Tiesioginės mikroskopijos tepinėlis daromas iš skreplių ar kitų organizmo skysčių – jais padengiamas objektinio stiklelio paviršius. Diagnostinis jautrumas – apie 18 proc. Galutiniai tiriamosios medžiagos pasėlio rezultatai gaunami tik po ≥ 5 sav., o surinkti vaikų, ypač mažamečių, skreplių yra labai sudėtinga ar net neįmanoma.

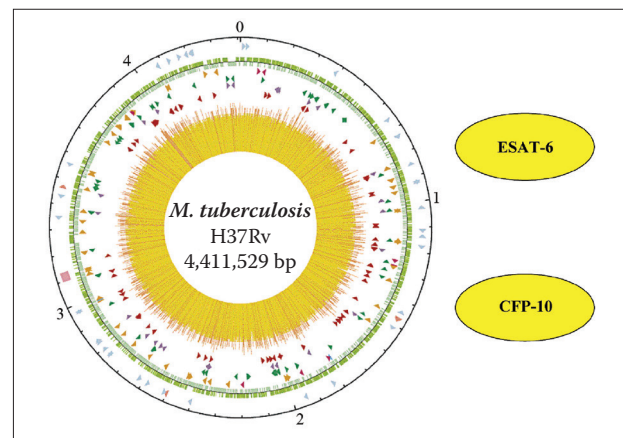
Įodinis tuberkulino mėginys (ITM) (žr. toliau) suaugusiesiems ir vaikams nėra pakankamai informatyvus tyrimo metodas, ypač didesnio sergamumo tuberkulioze kraštuose, kur vykdomas skiepijimas BCG, nes kyla kryžminė reakcija į BCG vakciną. Lietuvoje, kur vykdomas visuotinis skiepijimas BCG vakcina, diagnostikai naudojamas 2 TV tuberkulinas, kadangi didesnės koncentracijos gali sukelti teigiamą odos reakciją net ir seniai skiepytam asmeniui.

Radiologinis tyrimas – vienas dažniausiai taikomų metodų, tačiau ne visos ligos formos gali būti diagnozuojamos rentgenu. Metodas labai informatyvus nustatant plaučių tuberkuliozę [1].

Daug žadantys yra nauji **imuniniai *in vitro* diagnostiniai metodai** su specifiniais antigenais ESAT-6 ir CFP-10, gautais iš *M. tuberculosis* H37Rv regiono (2 pav.) [2, 10, 12, 13, 21, 37].

Antigenas ESAT-6 yra išskiriamas iš virulentiškų žmogaus tipo tuberkuliozės bakterijų, o ne iš BCG ar aplinkos mikobakterijų. Remiantis šiuo faktu buvo sukurtas ir Etiopijoje išbandytas [38] *in vitro* diagnostinis tyrimas, analizuojantis žmogaus periferinio kraujo mononuklearines ląsteles. Tyrimo metu matuotas IFN- γ kiekis, išskiriamas žmogaus periferinio kraujo mononuklearinių ląstelių, praėjus 5 dienoms po kultivavimo pradžios ir stimuliavimo ESAT-6. Iš pradžių buvo tiriamas IFN- γ , išskiriamas užkrečiama tuberkulioze sergančių, tuberkulinui teigiamų (skrepliuose nustatyta rūgščiai atsparių lazdelių) pacientų šeimos narių mononuklearinių ląstelių [38]. Po dvejų metų šie asmenys buvo tiriami dėl kliniškai aktyvios tuberkuliozės. Kliniškai aktyvi tuberkuliozė išsivystė tiems šeimos nariams, kurių mononuklearinės ląstelės gamino didelį kiekį IFN- γ . Tuo tarpu asmenys, kurių mononuklearinės ląstelės gamino nedaug IFN- γ , liko sveiki [49].

Buvo atliekami paraleliniai tyrimai su tuberkulinu; jie neatskleidė didelio skirtumo tarp šių dviejų grupių. Šeimos narius, sergančius ankstyva progresuojančia tuberkulioze, buvo galima nustatyti iš padidėjusio cirkuliuojančių limfocitų, reaguojančių į ESAT-6, kiekio. Tai pirmasis tyrimas, kai laboratorinis mėginys padė-



2 pav. *IN VITRO* TUBERKULIOZĖS DIAGNOSTIKAI NAUDOJAMI TB SPECIFINIAI ANTIGENAI [48]

jo atskirti tuberkulinui teigiamus asmenis, turinčius progresuojančių ankstyvos tuberkuliozės pažeidimų, kuriuos reikia gydyti antimikrobiniais vaistais, nuo asmenų, kuriems pažeidimai neprogresuoja, taigi gydyti nereikia.

Tuberkuliozės plitimo sustabdymas ar ligos išnainkinimas priklauso nuo latentinės tuberkuliozės ankstyvos diagnostikos ir gydymo.

***In vivo* diagnostinis įodinis tuberkulino mėginys** – vis dar plačiausiai taikomas tyrimas tuberkuliozės infekcijai diagnozuoti [13].

Diagnostika tuberkulinu – tai tyrimas žmogaus organizmo pakitusio reaktyvumo, atsiradusio užsikrėtus tuberkuliozės mikobakterijomis ar po skiepijimo BCG [13, 14]. Tuberkulinas, tuberkuliozės mikobakterijų baltymų ekstraktas, – tai antigenų mišinys, kuriam būdinga lėtojo tipo alerginė reakcija sensibilizuotame organizme, kai jame jau yra antikūnų prieš tuberkuliozės mikobakterijas. Pats tuberkulinas jų gamybos neskatina [14].

Užsikrėtus *M. tuberculosis*, prasideda imuninės reakcijos, kurias sužadina suaktyvėję makrofagai, o vykdo T limfocitai. Išsivysto klasikinė lėtojo tipo hipererginė reakcija į antigenus, kuriuos išskiria mikroorganizmas. Tokio pobūdžio reakcija vyksta atliekant tuberkulino mėginį sensibilizuotame organizme [11].

Pradinis sensibilizacijos procesas po užsikrėtimo trunka 6–8 savaites. Šio proceso metu įsijautrusių T limfocitų atsiranda sritiniuose limfmazgiuose ir patenka į cirkuliuojantį kraują. Kartotinė tokių limfocitų stimuliacija įodine tuberkulino injekcija pasibaigia vietine odos reakcija – susiformuoja kietulys, infiltratas [14]. Odos infiltratą sukelia ląstelių infiltracija, kurią sąlygoja įsijautrinę limfocitai. Stipriausia odos reakci-

Lentelė. IFN- γ TYRIMO IR ITM PALYGINIMAS

IFN- γ nustatymas	ITM
<i>In vitro</i> tyrimas	<i>In vivo</i> tyrimas
Dauginiai antigenai	Vienas antigenas
Nėra skatinančio (<i>Booster</i>) poveikio	Skatinamasis (<i>Booster</i>) poveikis
Vienas paciento vizitas	Du paciento vizitai
Minimalus subjektyvumas vertinant	Subjektyvumas vertinant
Rezultatai gaunami per vieną dieną	Rezultatai po 2–3 dienų

ja būna po 48–72 valandų, o vėliau lėtai blėsta, nors dažnai išlieka daugiau nei 96 valandas.

IN VITRO DIAGNOSTIKA – T LIMFOCITŲ IŠSKIRIAMO IFN- γ NUSTATYMAS

T limfocitai, atsakingi už organizmo apsaugą nuo tuberkuliozės, išskiria IFN- γ atsakydami į stimuliavimą *M. tuberculosis* antigenais.

Naujieji mėginiai, paremti T limfocitų išskiriamo IFN- γ nustatymu kraujyje:

- QuantiFERON-TB (QTB) (Celestis, St. Kilda, Viktorija, Australija);
- T SPOT TB (Oxford Immunotec, Oxford, Jungtinė Karalystė).

IFN- γ yra gana stabilus ir gali būti išmatuotas. Įvairių tyrimų duomenimis, tokių mėginių jautrumas yra 90–95 proc., o specifškumas – apie 100 proc. [38, 39, 40]. Kitaip nei ITM, šiems tyrimams atlikti pakanka vieno apsilankymo pas gydytoją. Šių mėginių interpretacija yra mažiau subjektyvi nei ITM, minėtų tyrimų rezultatų neveikia BCG skiepas, kryžminis reaktyvumas į atipines mikobakterijas, ŽIV, virusinė infekcija ar imunosupresija [40].

T limfocitų išskiriamą IFN- γ nustatantys mėginiai JAV, Kanadoje ir daugelyje Europos šalių patvirtinti kaip pagalbiniai metodai diagnozuojant latentinę tuberkuliozės infekciją [14]. Jie nustato ląstelinio imuniteto atsaką *in vitro* į tuberkuliozės infekciją, matuojant IFN- γ koncentraciją kraujyje, inkubuotame su *M. tuberculosis* specifiniais antigenais, ESAT-6 ir CFP-10. Nei ESAT-6, nei CFP-10 nėra *M. bovis* arba kitose aplinkos (netuberkuliozinėse) mikobakterijose, išskyrus *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai* ir *Mycobacterium marinum*. Taigi šie baltymai yra tikslūs tikros tuberkuliozės infekcijos žymenys ir, ki-

taip nei įodinio tuberkulino mėginio, jų visai neveikia skiepijimas BCG vakcina [40]. Mori su kolegomis neseniai paskelbė rezultatus tyrimo, kuriame jie naudojo ESAT-6 ir CFP-10 antigenus T limfocitų išskiriamam IFN- γ nustatyti BCG vakcina skiepytų asmenų grupėje. Apskaičiuota, kad mažos rizikos asmenims mėginio specifškumas yra 98,1 proc. Taigi rezultatai rodo, kad testas labai specifškas ir jautrus, įtakos jam neturi BCG vakcina [14].

Viename iš tyrimų, atliktų per tuberkuliozės protrūkį, tuberkuliozės infekcijai tarp kontaktinių asmenų nustatyti taikytas T limfocitų išskiriamo IFN- γ mėginys bei palyginti ITM ir IFN- γ tyrimų rezultatai (lentelė) [14].

Analizė atskleidė, kad mėginių rezultatų sutapimas puikus (94 proc. kappa vertė – 0,866), kraujo tyrimo neveikė skiepijimas BCG vakcina [10].

Apibendrinant galima teigti, kad T limfocitų išskiriamo IFN- γ mėginys diagnozuojant tuberkuliozės infekciją yra tikslus ir lengvai atliekamas.

APIBENDRINIMAS

Tuberkuliozė – infekcinė liga, varginanti žmoniją šimtmečiais, tačiau ją diagnozuoti tebėra sunku. Didėjantis sergamumas šia liga skatina mokslinius tyrimus, kuriais siekiama išsiaiškinti jautriausius ir specifškiausius metodus, galinčius palengvinti tuberkuliozės infekcijos diagnostiką, kartu ir kovą su šia liga.

Nustatant užsikrėtimą tuberkuliozės infekcija daugiau nei šimtą metų pasaulyje taikomas įodinis tuberkulino mėginys, kuris yra gana specifškas, bet mažai jautrumus, ypač BCG vakcina skiepytųjų populiacijoje. Ankstesnis skiepas BCG gali sąlygoti klaidingai teigiamą reakciją į tuberkuliną. Teigiamas ITM galimas esant ne tik *M. tuberculosis*, bet ir atipinių mikobakterijų sukeltai infekcijai, netinkamai techniškai atlikus mėginį. Odos reakcija į tuberkulino mėginį dažnai būna susilpnėjusi dėl virusinių infekcijų, po vakcinacijos gyvąja vakcina, esant išplitusiai tuberkuliozei dėl susilpnėjusio imuninio atsako ir pan. Tai lėmė, kad pastaraisiais metais pasaulyje imta ieškoti naujų informatyvesnių metodų, pagrįstų *M. tuberculosis* sukeltais imuninio atsako ypatumais, kurie padėtų sėkmingiau diagnozuoti tuberkuliozės infekciją, nepaisant vakcinacijos nuo tuberkuliozės.

EVALUATION OF INF- γ SECRETED BY T CELLS IN DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS INFECTION

EDITA HANSTED, BRIGITA ŠITKAUSKIENĖ
 CLINIC OF CHILDREN DISEASES KAUNAS UNIVERSITY OF MEDICINE
 DEPARTMENT OF PULMONOLOGY AND IMMUNOLOGY
 KAUNAS UNIVERSITY OF MEDICINE

Key words: tuberculosis, IFN- γ , T cell.

Summary. Tuberculosis (TB) is one of the oldest infectious diseases worldwide. The only method available for TB infection detection has been the tuberculin skin test (TST). Still, this tool has not proved itself as a sensitive method, especially when applying it to population previously vaccinated with BCG. Newly developed blood tests, based on detection of interferon-gamma (IFN- γ) secreting T cells responding to *M. tuberculosis* antigens, may prove themselves as more rapid, specific and sensitive methods for TB infection detection.

LITERATŪRA

- World Health Organisation. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO Report. Geneva: 2007.
- World Health Organisation. TB/HIV clinical manual. Second edition. Geneva: 2004.
- World Health Organisation. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO Report. Geneva: 2006.
- Dewan P, Sosnovskaja A, Thomsen V, Cicenaitė J. High prevalence of drug-resistant tuberculosis, Republic of Lithuania, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:170-4.
- Lietuvos sveikatos informacijos centras. Prieiga internete: www.lsic.lt
- Naudžiūnas A, Sakalauskas R. Kvėpavimo organų tuberkuliozė. Kaunas: 2001.
- World Health Organisation. Treatment of tuberculosis: guidelines for NATIONAL programmes. Third edition; Geneva: 2003.
- Surveillance of Tuberculosis in Europe-EuroTB. Prieiga internete: www.eurotb.org
- Zellweger JP, Zellweger A, Ansermet S, de Senarclens B, Wrighton-Smith P. Contact tracing using a new T-cell-based test: better correlation with tuberculosis exposure than the tuberculin skin test. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:1242-7.
- 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.
- American Thoracic Society, Center for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(4 Pt 2):S221-S247.
- Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson K A, Whelan A, Deeks J J, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001;357:2017-21.
- Pratt R, Grange J, Williams V. *Tuberculosis* 2005: 95-8.
- Schlosser D. *Tuberculosis and Mycobacterial infections*. 2005:61-70, 133-46.
- Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, Enders G, Regnath T. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:529-36.
- Arend SM, Thijsen SF, Leyten EM, Bouwmann JJ, Franken WP, Koster BF, et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:618-27.
- Choi CM, Kang CI, Kim DH. The role of TST in the diagnosis of latent tuberculosis infection among military personnel in South Korea. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:1342-6.
- Richeldi L, Ewer K, Losi M, Bergamini B, Millington K, Fabbri et al. T-cell-based diagnosis of neonatal multidrug-resistant latent tuberculosis infection. *Pediatrics* 2007; 119: e1-5.
- Richeli L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:736-42.
- Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn H, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007;45:322-28.
- Valiulis A, Misevičienė V, Sučilienė E, Bojarskas J, Steponavičienė D, Šlapkauskaitė D. Lietuvos vaikų tuberkuliozės diagnostikos, gydymo ir kontrolės sutarimas: įrodymais grįstos metodinės rekomendacijos gydytojams. *Vaikų pulmonologija ir alergologija* 2006;IX,2:3342-82.
- Wang J, Chou C, Lee L. Diagnosis of tuberculosis by an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. *Emerg Infect Dis* 2007;13:553-8.
- Lee J, Choi H, Park I. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 2006;28:24-30.
- Dannenber AM Jr. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991;12:228-33.
- Dannenber AM Jr., Rook GAW. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Blogom BR, ed. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington, DC: American Society for Microbiology 1994:459-83.
- Dannenber AM Jr. Immune mechanism in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis* 1989;11:369-78.
- Janeway CA Jr., Pravers P. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York, NY: Garland Publishing; 2001.
- North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004;22:599-623.
- Means TK, Wang S, Lien E. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999;163:3920-7.
- Brightbill HD, Libraty DH. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 1999;285:732-6.
- Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 2001;3:249-55.
- Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, et al. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 2004;304:1800-4.
- Long R, Light B, Talbot JA. Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:403-5.
- Jullien D, Stenger S, Ernst WA, Modlin R. CD1 presentation of microbial nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* 1997;99:2071-4.
- Nathan C. Mechanisms and modulations of macrophage activation. *Behring Inst Mitt* 1991;88:200-7.
- Šitkauskienė B. *Imunodeficitai*. Kaunas; 2006.
- Principles of the T SPOT TB Assay. Prieiga internete: http://www.oxfordimmunotec.com/How_It_Works_International
- Ravn P, Demissie A, Eguale T, Wondwosson H, Lein D, Amoudy A, et al. *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1999;179:637-45.
- Mantegani P, Piana F, Codecasa L, Laura G, Paolo S. Comparison of an in-house and a commercial RD I-based ELISPOT-INF- γ assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Med Res* 2006;4:266-72.
- Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochat T. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis. *Eur Respir J* 2007;30:722-8.