วารสาร Mahidol R2R e-Journal ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม-เมษายน 2567
Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

การศึกษาเปรียบเทียบ Interferon gamma (IFN-γ) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A comparison study of Interferon-gamma release assay between CLIA by LIAISON® XL and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

อรชุมา ล่อใจ[1]* มงคล คุณากร[1] ชวชล เศรษฐอุดม[1] และ เมวดี ปรีชา[1]
Onchuma Lohjai[1]*, Mongkol Kunakorn[1], Chavachol Setthaudom[1], and Mewadee Preecha[1]

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อวัณโรคในระยะแฝงในโรงพยาบาลรามาธิบดี โดยการตรวจวัดระดับ Interferon-Gamma (IFN-γ) จากหลักการ IFN-γ releasing assay (IGRA) โดยใช้ชุดทดสอบ QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ซึ่งเป็นการทดสอบด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ที่ได้รับการยอมรับจาก FDA หากแต่ชุดทดสอบนี้มีหลายกระบวนการในการทำการทดสอบและใช้ระยะเวลานาน ห้องปฏิบัติการจึงได้นำเทคนิคใหม่สำหรับตรวจวัดระดับ IFN-γ คือการทดสอบด้วยวิธี Chemiluminescent Immuno Assay (CLIA) โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers เพื่อนำมาใช้ทดแทน ลดภาระงานและเพิ่มความรวดเร็วในการรายงานผล วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความสัมพันธ์ของค่า IFN-γ ในกลุ่มตัวอย่าง 106 ราย

ผลการศึกษาความสอดคล้องของวิธี QFT-Plus (ELISA) เมื่อเทียบกับวิธี LIAISON® XL analyzers (CLIA) พบว่า ผลบวกมีความสอดคล้องร้อยละ 81.8 (9/11) ผลลบมีความสอดคล้องร้อยละ 95.5 (86/90) และผล indeterminate มีความสอดคล้องร้อยละ 100 (5/5) ผลรวมความสอดคล้องของทั้งสองวิธีอยู่ที่ร้อยละ 94.34 มีค่า Kappa Agreement เท่ากับ 0.799 โดยให้ผลที่ไม่สอดคล้องกัน 6 ราย จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ระดับ IFN-γ เมื่อตรวจวัดด้วย LIAISON® XL analyzers (CLIA) มีค่าความสอดคล้องกับวิธี QFT-Plus (ELISA) ค่าความสัมพันธ์ของการทดสอบ QFT-Plus (ELISA) ไม่ว่าจาก แอนติเจน TB1 หรือ TB2 มีความสัมพันธ์กับการทดสอบ LIAISON® XL analyzers (CLIA) เท่ากันแสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สันคือ 0.98 และ 0.96 ตามลำดับ

ดังนั้นเพื่อช่วยลดภาระงานและเพิ่มความรวดเร็วในการรายงานผล LIAISON® XL analyzers (CLIA) จึงเป็นทางเลือกที่สามารถนำมาใช้ทดแทนการทดสอบเดิมและใช้ในการตรวจหาการติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงได้รวดเร็ว

คำสำคัญ: การติดเชื้อวัณโรคระยะแฝง; Interferon-Gamma Release Assay; QuantiFERON-TB Gold Plus; LIAISON® XL analyzers (CLIA)

---

[1] ห้องปฏิบัติการ หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล

[1] Clinical Immunology Laboratory, Department of Pathology, Faculty of Medicine Ramathibodhi Hospital, Mahidol University Bangkok, Thailand

* Corresponding author: e-mail: bo_onchuma@yahoo.com

วารสาร Mahidol R2R e-Journal ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม-เมษายน 2567
Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

Abstract

The diagnosis of latent tuberculous infection (LTBI), in Ramathibodi Hospital, was detected in Interferon-gamma (IFN-γ) releasing assay (IGRA) by QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), however, it requires multiple steps of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). To substitute the original test, The LIAISON® XL analyzers (CLIA), has been developed. The automated analyzer of this test is used for decreased workload and turnaround time. The objective of this study was to compare the performance and examine the correlation between IFN-γ quantified by QFT-Plus (ELISA) and LIAISON® XL analyzers (CLIA). One hundred and six specimens were analyzed using QFT-Plus (ELISA) and LIAISON® XL analyzers (CLIA).

The correlation of IFN-γ results using LIAISON® XL analyzers (CLIA) compared with QFT-Plus (ELISA) showed 9 of 11 (81.8%) percentage agreement between the positive results in LIAISON® XL analyzers (CLIA) and QFT-Plus (ELISA), 86 of 90 (95.5%) percentage agreement between the negative results, and 5 of 5 cases (100%) percentage agreement between the indeterminate results. The total agreement of both methods was 94.34 percentage with Cohen's kappa values of 0.799 and 6 discordant results. In summary, the LIAISON® XL analyzers (CLIA) showed a correlation with QFT-Plus (ELISA) in the IFN-γ assay. Pearson's correlation coefficient of either TB1 or TB2 antigen of the QFT-Plus (ELISA) and the LIAISON® XL analyzers (CLIA) were 0.98 and 0.96.

Therefore, to reduce workload and increase speed of diagnostic, LIAISON® XL analyzers (CLIA) could be instant as the same test for detection of LTBI.

Keywords: latent tuberculosis infection; Interferon-Gamma Release Assay; QuantiFERON-TB Gold Plus; LIAISON® XL analyzers (CLIA)

บทนำ

วัณโรค (Tuberculosis หรือ TB) เป็นโรคติดต่อรุนแรง ซึ่งเป็น 1 ใน 10 สาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก โดยในปี 2017 องค์การอนามัยโลก (world health organization หรือ WHO) ได้มีการรายงานผู้ที่เสียชีวิตจากวัณโรคถึง 1.3 ล้านคน และมีผู้ติดเชื้อใหม่ถึง 10 ล้านคนทั่วโลก (Sotgiu et al., 2019) สาเหตุการเกิดวัณโรคเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Mycobacterium tuberculosis* complex สามารถติดต่อกันผ่านทางอากาศได้ ด้วยการหายใจ การจามการไอ หรือการอยู่ร่วมกับผู้ป่วยวัณโรคติดต่อกันเป็นเวลานาน การเกิดพยาธิสภาพของโรคนั้นเกิดขึ้นได้ทุกอวัยวะของร่างกาย อย่างไรก็ตามพบว่า อวัยวะที่ติดเชื้อวัณโรคและแสดงอาการป่วยที่พบได้บ่อย ได้แก่ ปอด ซึ่งมีสัดส่วนการรายงานสูงถึงร้อยละ 81.5 รองลงมา ได้แก่ อวัยวะอื่น ๆ ร้อยละ 17.7 และเยื่อหุ้มสมอง ร้อยละ 0.8 กระทรวงสาธารณสุข กองควบคุมโรค สำนักวัณโรค (2560); Petruccioli et al. (2016) และจากการสำรวจทางระบาดวิทยาพบว่าวัณโรคยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญในปัจจุบันที่ต้องเร่งได้รับ

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

แก้ไขโดยเฉพาะในบริเวณที่มีการระบาดสูง (100/100,000 ของประชากร)

ในประเทศไทยวัณโรคถือเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขอย่างมาก เนื่องจากเป็นบริเวณที่พบอัตราการติดเชื้อในปริมาณที่สูง โดยองค์การอนามัยโลกจัดให้ประเทศไทยเป็น 1 ใน 14 ประเทศของโลกที่มีภาระวัณโรค วัณโรคที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี และวัณโรคดื้อยาหลายขนานสูง โดย WHO คาดประมาณว่าในประเทศไทยมีผู้ป่วยวัณโรคราว 120,000 ราย ซึ่งสัมพันธ์กับการติดเชื้อเอชไอวี 15,000 ราย และดื้อยาหลายขนาน 4,500 ราย รวมทั้งพบผู้ป่วยวัณโรคดื้อยาหลายขนานชนิดรุนแรงมากถึง 13 ราย (กระทรวงสาธารณสุข, กองควบคุมโรค, สำนักวัณโรค, 2560)

การติดเชื้อวัณโรค เกิดขึ้นเมื่อสูดหายใจเอาเชื้อวัณโรคเข้าไปถึงถุงลมในปอด หลังจากที่เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อหรือควบคุมเชื้อได้อย่างสมบูรณ์จึงทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคตามมา ถ้าเชื้อวัณโรคแบ่งตัวในเนื้อปอดมากขึ้น อาจก่อให้เกิดการลุกลามไปตามหลอดน้ำเหลือง (lymphatic vessels) ไปสู่ต่อมน้ำเหลืองที่ขั้วปอด (hilar lymph node) ทำให้ต่อมน้ำเหลืองโตขึ้น และสามารถกระจายเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง เข้าสู่กระแสเลือดและกระจายสู่อวัยวะต่าง ๆ เช่น สมอง กระดูก ไต ปอด เป็นต้น (กระทรวงสาธารณสุข, กองควบคุมโรค, สำนักวัณโรค, 2560)

ในผู้สัมผัสผู้ป่วยวัณโรคพบว่ามีมากถึงร้อยละ 70 ที่ไม่มีการติดเชื้อ มีเพียงร้อยละ 30 เท่านั้นที่มีการติดเชื้อวัณโรค โดยส่วนใหญ่จะไม่มีอาการแสดงของโรค เรียกว่าการติดเชื้อวัณโรคแฝง (Latent Tuberculosis infection หรือ LTBI) ไปสู่การติดเชื้อในระยะลุกลามได้ โดยการติดเชื้อวัณโรคแฝง ตัวเชื้อวัณโรคจะยังคงมีชีวิตอยู่ในร่างกาย แต่ผู้ป่วยร้อยละ 90 จะไม่มีการแสดงอาการตลอดชีวิตและไม่สามารถแพร่กระจายเชื้อไปยังผู้อื่นได้ มีเพียงร้อยละ 10 ที่ผู้ป่วยจะเกิดพยาธิสภาพและสามารถแพร่กระจายเชื้อ อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อวัณโรคแฝงหากภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลง จะส่งผลให้ภูมิคุ้มกันไม่สามารถควบคุมการแบ่งตัวของเชื้อและจะทำให้ผู้ป่วยป่วยเป็นวัณโรคในที่สุด (reactivation tuberculosis) โดยผู้ป่วยที่เป็นวัณโรคหากไม่ได้รับการรักษา ร้อยละ 50-65 พบว่าเสียชีวิตภายใน 5 ปี โดยผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อวัณโรคแฝงและพัฒนาเป็นวัณโรคจะพบได้มากในผู้ที่มีการติดเชื้อเอชไอวี และผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เช่น ผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายอวัยวะ Bergamini et al. (2009); Matteelli et al. (2015); Petruccioli et al. (2016); Pourakbari et al. (2019); Sester et al. (2011); Sester et al. (2014))

แม้ปัจจุบันยังไม่มีวิธีมาตรฐานสำหรับการตรวจคัดกรอง LTBI แต่ WHO ได้มีการยอมรับการตรวจคัดกรอง LTBI 2 วิธีการทดสอบ ซึ่งเป็นการตรวจหาการตอบสนองของร่างกายต่อการติดเชื้อวัณโรค (Immune reactivity testing)โดยการวัดปฏิกิริยาของร่างกายเมื่อได้รับสารกระตุ้น แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบทั้งสองวิธีดังกล่าวไม่สามารถให้การวินิจฉัยแยกระหว่างการติดเชื้อในร่างกายระยะแฝงกับวัณโรคระยะลุกลามได้ โดยวิธีการทดสอบ ประกอบด้วย

1. การทดสอบทางผิวหนัง (Tuberculin skin test หรือ TST) คือการฉีด purified protein derivative (PPD) ปริมาตร 0.1 มิลลิเมตร เข้าใต้ชั้นผิวหนังบริเวณหน้าแขนและอ่านผลโดยวัดขนาดของตุ่มแดง (Induration) ที่เกิดขึ้นภายใน 48-72 ชม.หลังการฉีด ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้ทดสอบจะต้องกลับมาให้เจ้าหน้าที่อ่านผลการทดสอบตามระยะเวลาที่กำหนด ในผู้ที่ให้ผลลบ (ตุ่มแดงขนาดน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร) จะต้องมาทำการตรวจซ้ำอีกครั้งหลังผ่านไป 1 สัปดาห์ แม้ว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและราคาไม่แพง แต่ในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ติดเชื้อเอชไอวี ผู้ที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันอาจก่อให้เกิดผลลบปลอม หรือในผู้ที่เคยได้รับวัคซีน Bacillus Calmette–Guérin (BCG) และผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกลุ่ม Nontuberculous mycobacteria NTM) อาจก่อให้เกิดผลบวกปลอมได้

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

2. การทดสอบ Interferon-gamma (IFN- γ) release assay (IGRA) วิธีนี้เป็นการตรวจวัดระดับสาร IFN- γ ที่หลั่งออกมาเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ได้รับการกระตุ้นจากเชื้อวัณโรค โดยเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงและสามารถตรวจ LTBI ได้ในผู้ป่วยภูมิคุ้มกันต่ำหรือได้รับยากดภูมิคุ้มกัน และไม่ให้ผลบวกปลอมในผู้ที่เคยได้รับวัคซีน BCG หรือผู้ที่ติดเชื้อ NTM โดยหลักการของการทดสอบคือ เมื่อบุคคลได้รับเชื้อวัณโรคเข้าสู่ร่างกายระบบภูมิคุ้มกันจะมีการตอบสนองเพื่อทำลายเชื้อ และมีการสร้าง memory cells ซึ่งเป็นกลุ่ม mononuclear cells เช่น CD4+T cells และ CD8+ T cells ขึ้น โดยเซลล์กลุ่มนี้จะสามารถหลั่ง pro-inflammatory cytokines โดยเฉพาะ IFN- γ ดังนั้นหากมีการนำเม็ดเลือดขาวของคนที่มี LTBI มากระตุ้นด้วยแอนติเจนของเชื้อวัณโรคอีกครั้ง จะทำให้ mononuclear cells ที่เคยรู้จักหรือสัมผัสกับเชื้อวัณโรคมาก่อน (sensitized) สามารถสร้างและปล่อยสาร IFN-γ เพิ่มขึ้นในเลือดเมื่อได้รับการกระตุ้นครั้งที่สองและสามารถตรวจวัดได้โดยใช้หลักการ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ chemiluminescent immunoassay (CLIA) ซึ่งสามารถทำการทดสอบโดยชุดทดสอบปัจจุบันที่ WHO ให้การรับรองการตรวจ คือ QuantiFERON-TB (QFT) Gold plus และ T-SPOT โดยห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ได้เปิดให้บริการ QuantiFERON-TB gold plus ด้วยวิธี plate ELISA format ซึ่งจะต้องรวบรวมจำนวน sample เพื่อทำการทดสอบจำนวนมาก ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีในการตรวจวัดด้วยเครื่องอัตโนมัติ เพื่อลดระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบและเพิ่มความรวดเร็วในให้บริการห้องปฏิบัติการฯ จึงมีความสนใจที่จะนำมาทดแทนการทดสอบเดิมโดยทำการศึกษาเปรียบเทียบการทดสอบ Interferon gamma (IFN-γ) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISONX (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus โดยทั้งสองวิธีนั้นมีขั้นตอนวิธีการ และระยะเวลาในการทดสอบแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างของขั้นตอน วิธีการและระยะเวลาในการทดสอบ QuantiFERON-TB ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus

วิธีการ	**ELISA**		**CLIA**	
ปริมาณตัวอย่างที่ใช้	50 ไมโครลิตร		210 ไมโครลิตร	
	ขั้นตอนการทำ	**ระยะเวลาที่ใช้**	**ขั้นตอนการทำ**	**ระยะเวลาที่ใช้**
Pre-analytical Process	1.เตรียมปั่น Sample ก่อนทำการทดสอบ	15 นาที	1.เตรียมปั่น Sample ก่อนทำการทดสอบ	15 นาที
	2.เตรียม Conjugate	5 นาที	2.เตรียมเครื่อง/maintenance	60 นาที
	3.เตรียม Standard	5 นาที	3.เตรียม Conjugate	20 นาที
			4.เตรียมน้ำยาสำหรับการทดสอบ	20 นาที
			5.เตรียม Calibrator	20 นาที
			6.เตรียม Control	20 นาที

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

วิธีการ	**ELISA**		**CLIA**	
ปริมาณตัวอย่างที่ใช้	50 ไมโครลิตร		210 ไมโครลิตร	
	ขั้นตอนการทำ	**ระยะเวลาที่ใช้**	**ขั้นตอนการทำ**	**ระยะเวลาที่ใช้**
Analytical process	4.pipet (ขั้นตอนที่ 1-3) ลง ELISA plate	20 นาที	7.Run Calibrator/Control	46 นาที
	5.Incubate ELISA plate	120 นาที	8.Run sample	46 นาที (25 patients/hour)
	6.ล้าง plate	20 นาที		
	7.Incubate plate with substrate	30 นาที		
	8.Stop reaction และ วัด OD	30 นาที		
Post-analytical Process	9.ลงข้อมูล และ analyte sample ด้วย โปรแกรม QuantiFERON® TB Gold Plus Analysis Software	30 นาที	9.Analyte sample by LIAISON® QuantiFERON® Software	20 นาที
รวมระยะเวลา	275 นาที (4 ชั่วโมง กับ 35 นาที)		247 นาที (4 ชั่วโมง กับ 7 นาที)	
รวมระยะเวลาหากต้องการ Run ซ้ำหรือ stat case	275 นาที (4 ชั่วโมง กับ 35 นาที)		46 นาที	

วัสดุและวิธีการ

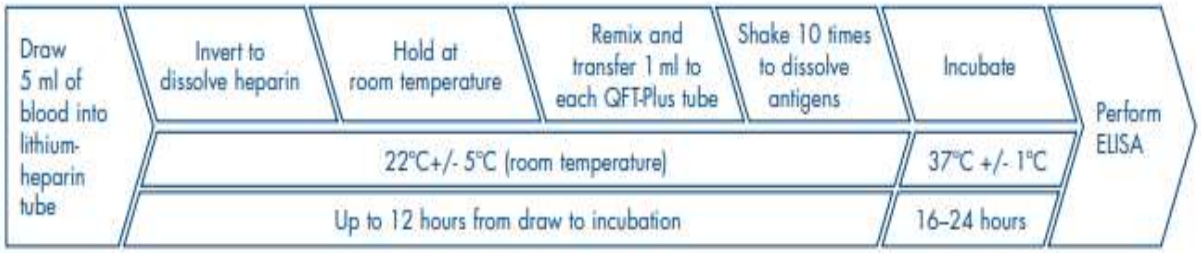
กลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา

กลุ่มประชากรที่เข้ามารับบริการตรวจวินิจฉัย QuantiFERON-TB gold plus ที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2564 จนถึง เดือนพฤศจิกายน 2564 จำนวน 106 คน โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมวิจัย (Inclusion criteria) คือมีปริมาณสิ่งส่งตรวจที่เป็นเลือดครบส่วนในหลอดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด Lithium Heparinized blood อย่างน้อย 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 17-27 ℃ นำส่งไม่เกิน 12 ชั่วโมงหลังจากทำการเจาะเลือด สำหรับทำการวิเคราะห์ QuantiFERON-TB gold plus ในห้องปฏิบัติการและมีพลาสมาตัวอย่างหลังจากทำการทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus ข้างต้นเหลืออย่างน้อย 500 µL ต่อหลอดทดสอบ โดยการศึกษานี้ได้รับการอนุมัติโดยคณะกรรมการสิทธิมนุษยชนที่เกี่ยวข้องการวิจัยเกี่ยวกับมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล (COA. MURA2021/559)

การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

Lithium-Heparin Tube Room Temperature Storage and Handling- up to 12 hours

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6



รูปที่ 1 แผนผังขั้นตอนในการเตรียมสิ่งส่งตรวจ : จากหลอด Heparinized blood ในอุณหภูมิห้อง(ไม่เกิน 12 ชั่วโมง นับตั้งแต่เจาะเก็บสิ่งส่งตรวจ)
(ที่มา: QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) Blood Collection Tubes Package Insert)

1. การวิเคราะห์หาค่า IFN-γ ด้วย QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), QIAGEN โดย plate ELISA format มีขั้นตอนการดำเนินการและวิธีการวิเคราะห์ผลการทดสอบดังนี้
ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

IFN-γ detection

1. เติม working conjugate 50 µL ผสมกับ standard หรือพลาสมา 50 µL

2. Incubate plate ที่อุณหภูมิห้อง 120 ± 5 นาที

3. ล้าง plate ด้วย buffer ครั้งละ 400 µL จำนวน 6 ครั้ง โดยทิ้ง plate ไว้ครั้งละ 5 วินาที

4. ใส่ substrate 100 µL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

5. ใส่ stopping solution 50 µL

6. วัด OD ที่ 450/630 nm

7.นำไปประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย QuantiFERON® TB Gold Plus Analysis Software

2. การวิเคราะห์หาค่า IFN-γ ด้วย QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus), LIAISON® XL, DiaSorin **มีขั้นตอนการดำเนินการและวิธีการวิเคราะห์ผลการทดสอบดังนี้**
ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์

1. ทำ Calibrate และ Control ก่อนการทดสอบ

2. นำ Sample ที่เหลือจากการทำการทดสอบด้วยวิธี plate ELISA format นำมาทำการทดสอบด้วยเครื่อง LIAISON® XL analyzers

3. ประเมินผลการตรวจวิเคราะห์ด้วย LIAISON® QuantiFERON® Software ซึ่งจะประเมินผลเมื่อผลการทำ Calibrator และ Control มีค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบการทดสอบ Interferon gamma (IFN-γ) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus โดยใช้โปรแกรม Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) Version 18.0 ทดสอบการกระจายตัวของข้อมูลโดยใช้สถิติ Kolmogorov-Smirnov ใช้ Cohen's kappa coefficient ในการเปรียบเทียบความสอดคล้องของสองวิธี ค่า Cohen's kappa coefficient คือ<0.00, 0.00-0.20, 0.21-0.40, 0.41-0.60, 0.61-0.80, 0.81-1.00 บ่งชี้ระดับความสอดคล้อง ไม่มีความสอดคล้อง ความ

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

สอดคล้องเล็กน้อย ความสอดคล้องพอใช้ ความสอดคล้องปานกลาง ความสอดคล้องดี และความสอดคล้องดีมาก ตามลำดับ ใช้โปรแกรม Microsoft Excel คำนวณค่าเฉลี่ย Standard derivative Min Max ของข้อมูลเพื่อดูความแตกต่างของค่าที่วัดได้ สร้างกราฟ correlation plots และใช้สถิติวิเคราะห์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson' s correlation coefficient) ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับ IFN-γ ของเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน (ELISA) สำหรับการทดสอบความแตกต่างระดับ IFN-γ ในแต่ละวิธี ใช้สถิติ Wilcoxon Matched pairs Signed rank test ในการวิเคราะห์ข้อมูล โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

ลักษณะกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มประชากรที่เข้ามารับบริการตรวจวินิจฉัย QuantiFERON-TB gold plus ที่ห้องปฏิบัติการภูมิคุ้มกันวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2564 จนถึง เดือนพฤศจิกายน 2564 ที่เข้าเกณฑ์การคัดเลือกตัวอย่างเข้าร่วมวิจัย (Inclusion criteria) จำนวน 106 คน (N = 106) โดยแบ่งเป็น ผู้รับบริการภายในโรงพยาบาลจำนวน 74 ราย และ ผู้รับบริการภายนอกโรงพยาบาล(ซึ่งไม่สามารถติดตามอายุและประวัติสุขภาพของผู้รับบริการได้) จำนวน 32 ราย

การเปรียบเทียบผลการทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน (ELISA) ในชุดทดสอบ

ในกลุ่มตัวอย่าง 106 ราย การทดสอบ Interferon gamma (IFN-γ) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus แล้วแปลผลการทดสอบด้วยตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแปลผลการทดสอบ (QuaniFERON-TB ELISA&CLIA)

<table>
<tr><th>Nil (IU/mL)</th><th>TB1-Nil (IU/mL)</th><th>TB2-Nil (IU/mL)</th><th>Mitogen-Nil (IU/mL)</th><th>Result</th><th>Report/Interpretation</th></tr>
<tr><td rowspan="4">≤ 8.0</td><td>≥ 0.35 และ
≥ 25% of Nil</td><td>Any</td><td rowspan="2">Any</td><td rowspan="2">Positive</td><td rowspan="2">M.tuberculosis
Infection</td></tr>
<tr><td>Any</td><td>≥ 0.35 และ
≥ 25% of Nil</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="2">< 0.35
หรือ
≥ 0.35 และ < 25% of Nil</td><td>≥ 0.5</td><td>Negative</td><td>M.tuberculosis
infection Not likely</td></tr>
<tr><td>< 0.5</td><td rowspan="2">Indeterminate</td><td rowspan="2">Likelihood of
M.tuberculosis infection
Cannot be determined</td></tr>
<tr><td>> 8.0</td><td colspan="3">Any</td></tr>
</table>

* Responses to the Mitogen positive control (and occasionally TB Antigens) can be outside the range of the microplate reader. This has no impact on test results. Values >10 ml are reported by the QFT-Plus software as >10 IU/ml.

† Where M. tuberculosis infection is not suspected, initially positive results can be confirmed by retesting the original plasma samples in duplicate in the QFT-Plus ELISA. If repeat testing of one or both replicates is positive, the individual should be considered test positive.

‡ Refer to the "Troubleshooting" section for possible causes.

§ In clinical studies, less than 0.25% of subjects had IFN-γ levels of >8.0 IU/ml for the Nil value

วารสาร Mahidol R2R e-Journal ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 ประจำเดือนมกราคม-เมษายน 2567
Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

เมื่อแปลผลการทดสอบทั้งสองวิธี ได้ค่าการทดสอบโดยคำนวณค่าเฉลี่ย Standard derivative Min Max ของข้อมูลที่ได้ โดยมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบผลการทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus ด้วยเครื่องอัติโนมัติ LIASON@XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน (ELISA) ในชุดทดสอบกลุ่มตัวอย่าง

QuantiFERON-TB gold plus	ELISA			CLIA		
	Mean	SD	Min-Max	Mean	SD	Min-Max
NIL	0.073	0.090	0.010-0.600	0.160	0.200	0.030-1.490
TB1	0.232	0.721	0.010-6.390	0.397	1.166	0.025-10.000
TB2	0.238	0.767	0.010-6.700	0.419	1.244	0.023-10.000
Mitogen	5.602	2.467	0.020-9.440	8.438	3.052	0.041-10.000
TB1-NIL	0.159	0.712	-0.270-6.280	0.236	1.153	-0.421-9.812
TB2-NIL	0.165	0.760	-0.210-6.590	0.257	1.232	-0.542-9.812
Mitogen-NIL	5.528	2.453	0.000-9.380	8.278	3.030	0.011-9.953

เมื่อนำมาทดสอบความสอดคล้องของการทดสอบทั้งสองวิธีพบว่า ผลบวกมีความสอดคล้อง 81.8% (9/11) ผลลบมีความสอดคล้อง 95.5% (86/90) และผล indeterminate มีค่าความสอดคล้อง 100% (5/5) และเมื่อใช้สถิติเพื่อดูความสอดคล้องของทั้งสองวิธีโดยใช้ Cohen's kappa coefficient ให้ค่า Over All Agreement เท่ากับ 94.34% มีค่า Kappa Agreement เท่ากับ 0.799 นอกจากนี้เมื่อนำมาทดสอบความสอดคล้อง พบว่ามีความสอดคล้องดี (Substantial) กับวิธีมาตรฐาน (ELISA) อีกทั้งยังให้ค่าผลความสอดคล้องของผลบวกของทั้งสองวิธีให้ผล Positive Agreement เท่ากับ 100% ผลลบให้ผล Negative Agreement เท่ากับ 97.73% ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การประเมินค่าความสอดคล้องของการสอบเทียบ

		EIA			
		Positive	Negative	Indeterminate	Total
CLIA	Positive	9	2	0	11
	Negative	0	86	4	90
	Indeterminate	0	0	5	5
Total		9	88	9	106

Over All Agreement = 94.34 %

Positive Agreement = 100 %

Negative Agreement = 97.73 %

Kappa Agreement = 0.799

ค่าสถิติ Kappa	ระดับความสอดคล้องระหว่างผู้ประเมิน
0.81-1.00	ความสอดคล้องดีมาก (Almost Perfect)
0.61-0.80	ความสอดคล้องดี (Substantial)
0.41-0.60	ความสอดคล้องปานกลาง (Moderate)
0.21-0.40	ความสอดคล้องพอใช้ (Fair)
0.00-0.20	ความสอดคล้องเล็กน้อย (Slight)
น้อยกว่า 0.00	ไม่มีความสอดคล้อง (Poor)

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

นอกจากนี้มี 6 รายที่ให้ผลไม่ตรงกันระหว่างสองวิธี โดยทุกรายนั้นได้ทำการทดสอบซ้ำและได้ผลการทดสอบเช่นเดิม แบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 2 ราย วิธีมาตรฐาน ELISA ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus ให้ผลเป็นลบ และทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) ให้ผลเป็นบวก กลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ราย วิธีมาตรฐาน ELISA ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus ให้ผลเป็น Indeterminate และทดสอบด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) ให้ผลเป็นลบ สำหรับผลที่ไม่ตรงกันทั้ง 6 รายไม่สามารถคำนวณข้อมูลทางสถิติได้ เนื่องจากเป็นกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็ก โดยมีรายละเอียดดังแสดงใน ตารางที่ 5

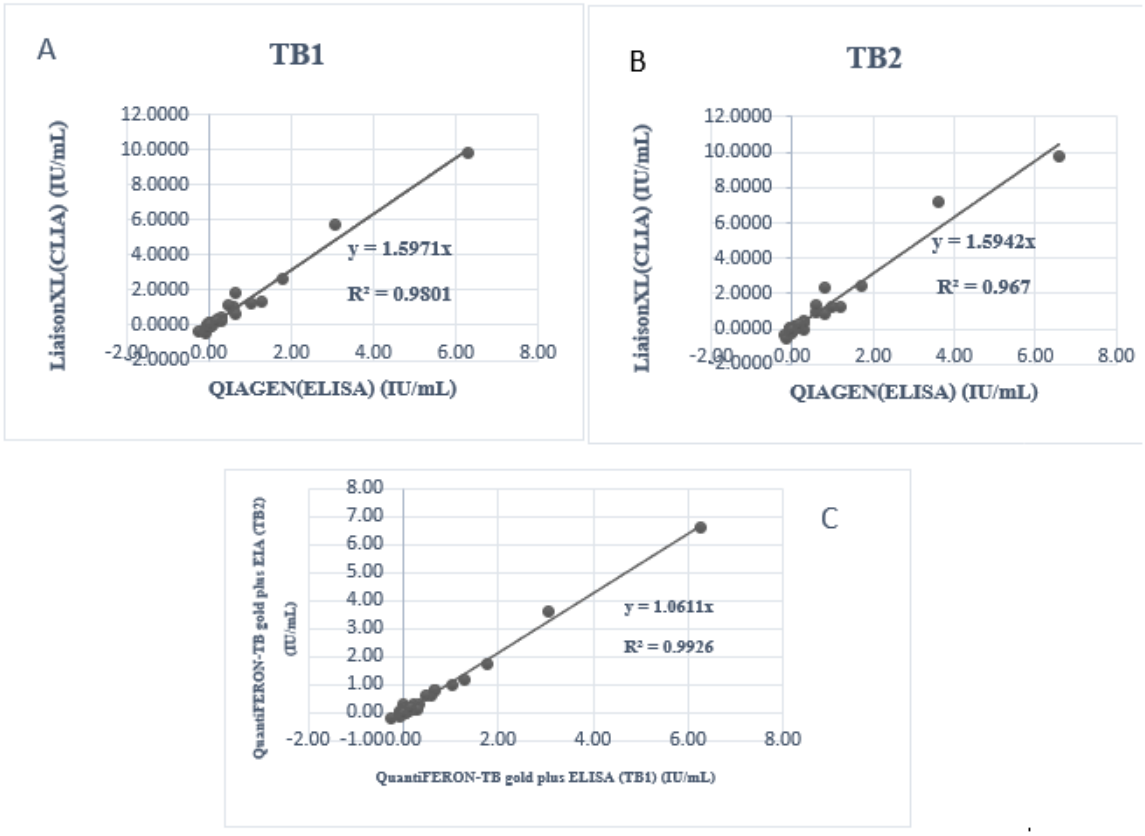
ตารางที่ 5 ความแตกต่างของตัวอย่างการทดสอบในรายที่ไม่สอดคล้องกัน

No	Subject No.	LIAISON® XL **(CLIA)**				**วิธีมาตรฐาน (ELISA)**			
		TB1 Ag-Nil	**TB2 Ag-Nil**	**Mitogen-Nil**	**Results**	**TB1 Ag-Nil**	**TB2 Ag-Nil**	**Mitogen-Nil**	**Results**
1	W51462	0.3920	0.4850	9.9150	POS	0.23	0.27	6.29	NEG
2	W51553	0.4247	0.3787	9.9207	POS	0.32	0.28	6.78	NEG
3	W51500	-0.0470	-0.0154	0.6201	NEG	0.00	-0.01	0.26	IND
4	W51506	-0.0300	-0.0240	0.6250	NEG	0.01	0.00	0.24	IND
5	W51511	0.0124	0.0010	3.5754	NEG	-0.01	-0.03	0.23	IND
6	W51569	-0.0228	-0.0191	1.7715	NEG	0.56	-0.02	-0.01	IND

การเปรียบเทียบระดับ Interferon gamma (IFN-γ) ด้วยเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน (ELISA) ในชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus

ในกลุ่มตัวอย่าง 106 ราย จากตารางที่ 3 สามารถสรุปได้ว่า ในการวิเคราะห์ผลระดับ IFN-γ ด้วยวิธีมาตรฐาน ELISA ได้ค่าเฉลี่ยของหลอด TB1-NIL เท่ากับ 0.159 IU/ml หลอด TB2-NIL เท่ากับ 0.165 IU/ml และหลอด mitogen-NIL เท่ากับ 5.528 IU/ml การวิเคราะห์ผลระดับ IFN-γ ด้วยวิธี CLIA ด้วยเครื่องอัตโนมัติ ได้ค่าเฉลี่ยของหลอด TB1-NIL เท่ากับ 0.236 IU/ml หลอด TB2-NIL เท่ากับ 0.257 IU/ml และหลอด mitogen-NIL เท่ากับ 8.278 IU/ml เมื่อนำผลการวัดระดับ IFN-γ ระหว่างหลอด TB1 กับหลอด TB1 และนำผลการวัดระดับ IFN-γ ระหว่างหลอด TB2 กับหลอด TB2 ของแต่ละวิธีหลักการมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ Wilcoxon Matched pairs Signed rank test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.203 และ p = 0.372 ตามลำดับ) ซึ่งค่า IFN-γ มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 2 หลักการ โดยเมื่อทดสอบความสัมพันธ์ด้วยสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (Linear regression)พบว่าหลอด TB1 ของทั้งสองหลักการ ให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9801 และหลอด TB2 ของทั้งสองหลักการให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.9967 (รูปที่ 2)

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณระดับ IFN-γ ของ LIAISON® XL analyzers (CLIA) และวิธี QFT-Plus (ELISA) โดยภาพ A คือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหลอด TB1 Ag ของ LIAISON® XL analyzers (CLIA) และหลอด TB1 Ag ของวิธี QFT-Plus ภาพ B คือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหลอด TB2 Ag ของ LIAISON® XL analyzers (CLIA) และหลอด TB2 Ag ของวิธี QFT-Plus และสุดท้ายภาพ C คือกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างหลอด TB1 Ag และหลอด TB2 Ag ของวิธี QFT-Plus (R คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน)

สรุปและวิจารณ์ผล

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำศึกษาผลการวิเคราะห์การติดเชื้อวัณโรคระยะแฝงด้วยการเปรียบเทียบระดับ Interferon gamma (IFN-γ) จากเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) กับวิธีมาตรฐาน (ELISA) ด้วยชุดทดสอบ QuantiFERON-TB gold plus จากจำนวนตัวอย่าง 106 ราย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นความสอดคล้องของทั้งสองวิธีอยู่ในระดับสูงเท่ากับ 94.34% โดยมีค่า Kappa เท่ากับ 0.799 แต่มีจำนวน 6 รายที่ผลการทดสอบไม่ตรงกันกับทั้งสองวิธี ตามตารางที่ 5 โดย 2 ราย คือ W51462 และ W51553 ผลการวิเคราะห์จากเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) ให้ผลเป็นบวกแต่ผลจากวิธีมาตรฐาน (ELISA) ให้ผลเป็นลบ ซึ่งกลุ่มตัวอย่าง 2 รายนี้เป็นกลุ่มตัวอย่างที่รับมาจากนอกโรงพยาบาลจึงไม่สามารถวิเคราะห์ข้อมูลจากสิ่งส่งตรวจได้ หรืออาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนระหว่างการทดสอบเช่น ขั้นตอนก่อนการทำการทดสอบคือ ความผิดพลาดจากขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงที่ไม่เหมาะสมอันเกิดจากความเร็วและระยะเวลาส่งผลให้ ในระหว่างที่ดูดสิ่งส่งตรวจไปเพื่อวิเคราะห์นั้น อาจปิเปตไปโดนเจลที่กั้นระหว่างเลือดและพลาสมา ทำให้เกิดทั้งผลบวกปลอมและผลลบปลอม จึงควรตรวจสอบก่อนทำการทดสอบและ

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

ขั้นตอนของการปิเปตดูดให้ถูกต้องแม่นยำทุกครั้งเพื่อลดความคลาดเคลื่อนดังกล่าว นอกจากนี้จากงานวิจัย Bisognin et.al. (2020) กล่าวว่าการวิเคราะห์สิ่งส่งตรวจด้วยวิธี CLIA นั้นอาจให้ระดับ Interferon gamma (IFN-γ) ที่สูงกว่าวิธีมาตรฐาน ซึ่งตรงกับผลการทดสอบนี้ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดสอบของทั้งสองวิธีโดยแสดงดังตารางที่ 3 นอกจากปัจจัยข้างต้น ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างตรวจ 4 ราย คือ W51500, W51506, W51511 และ W51569 ซึ่งพบว่า ตัวอย่างทั้ง 4 รายนี้เป็นกลุ่มเด็กทั้งหมดที่มีข้อมูลอื่นเช่น อายุ หรือประวัติสุขภาพของผู้ป่วย เนื่องจากเป็นสิ่งส่งตรวจที่รับมาจากภายนอกห้องปฏิบัติการ โดยให้ผลการวิเคราะห์จากเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) ให้ผลเป็นลบ พบว่ามีระดับ Interferon gamma (IFN-γ) ที่ได้สูงกว่าค่า Cut-off (> 0.35 IU/mL) ของการทดสอบเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน (ELISA) ที่มีระดับ Interferon gamma (IFN-γ) ต่ำกว่าค่า Cut-off จึงให้ผลการวิเคราะห์เป็นกำกึ่ง (Indeterminate) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากความแตกต่างกันในส่วนของหลักการและวิธีการทดสอบกล่าวคือ จากเครื่องอัตโนมัติ LIAISON® XL analyzers (CLIA) ใช้หลักการ Chemiluminescent Immunoassay(CLIA) ส่วน QFT-Plus ใช้หลักการ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) จึงอาจเป็นไปได้ที่จะเป็นอีกปัจจัยให้ผลการทดสอบแตกต่างกันเนื่องจาก CLIA มีความไวในการทดสอบมากกว่า ผลการทดสอบจึงพบว่า ระดับ Interferon gamma (IFN-γ) ที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี CLIA มีค่าสูงกว่าวิธี ELISA

ปัจจุบันนี้โรควัณโรคยังคงมีการติดเชื้อและส่งผลให้เกิดการตายทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย ที่ยังคงมีความชุกโดยเฉพาะคนไข้ในกลุ่ม Immunocompromised หรือผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะที่ต้องใช้ยากดภูมิ มีความเสี่ยงที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำ การตรวจวินิจฉัยและการได้รับการรักษาวัณโรคระยะแฝง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อในอนาคต ดังนั้นการเลือกการทดสอบที่มีความไวและความจำเพาะสูง มีระยะเวลาในการออกผลรวดเร็ว จะช่วยให้ผู้ป่วยสามารถเข้ารับการรักษาเพื่อป้องกันการส่งต่อเชื้อให้กับคนใกล้ชิดในอนาคต

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับของ Interferon gamma (IFN-γ) ด้วยวิธี CLIA สามารถนำมาใช้ทดแทนในงานตรวจวิเคราะห์หาวัณโรคระยะแฝงจากวิธีมาตรฐาน มีประโยชน์คือมีประสิทธิภาพทั้งด้านความไวและความจำเพาะเทียบเท่ากับการตรวจวินิจฉัยแบบเดิมคือ ELISA นอกจากนี้หากนำเครื่องอัตโนมัติเข้ามาให้บริการ ยังช่วยเพิ่มความแม่นยำของผลการทดสอบในแต่ละครั้งด้วยน้ำยามาตรฐานสำหรับสอบเทียบและสารควบคุมคุณภาพการทดสอบ สำหรับในด้านการให้บริการทดสอบยังมีความสะดวกรวดเร็ว มีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ช่วยลดความผิดพลาดในขั้นตอนการปฏิบัติงาน และลดเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์สามารถรองรับปริมาณงานที่เพิ่มมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองหัวหน้าหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา นางกาญจนา ศรีวาณิชรักษ์ นางสาวอริสรา สมุทรผ่อง และผู้ปฏิบัติงานในหน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี ที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณ บริษัท เอ็มพี กรุ๊ป (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำยา QuantiFERON-TB gold plus, LIAISON® XL, DiaSorin และอุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์หาวัณโรคแฝงในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สำนักวัณโรค กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. (2560, 1 พฤศจิกายน). *แผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติ พ.ศ.2560-2564*. กระทรวงสาธารณสุข.

Received: March 21, 2022, Revised: November 14, 2022, Accepted: November 23, 2022
http://doi.org/10.14456/jmu.2024.6

https://www.tbthailand.org/download/Manual/หนังสือแผนยุทธศาสตร์วัณโรคระดับชาติ%20FINAL_new%20des.pdf

Bergamini, BM., Losi, M., Vaienti, F., D'Amico, R., Meccugni, B., Meacci, M., De Giovanni, D., Rumpianesi, F., Fabbri, LM., Balli, F., & Richeldi, L. (2009). Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*, *123*(3), 419-24.

Bisognin, F., Lombardi, G., Re, MC., & Dal Monte, P. (2020). QuantiFERON-TB Gold Plus with Chemiluminescence Immunoassay: Do We Need a Higher Cutoff?. *Journal of Clinical Microbiology, 58*(10), 780-20.

Matteelli, A., Lönnroth, K., Getahun, H., Falzon, D., Migliori, GB., & Raviglione, M. (2015). Numbers needed to treat to prevent tuberculosis. *European Respiratory Journal*, *46*(6), 1838-39.

Petruccioli, E., Scriba, TJ., Petrone, L., Hatherill, M., Cirillo, DM., Joosten, SA., Ottenhoff, TH., Denkinger, CM., & Goletti, D. (2016) Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *European Respiratory Journal*, *48*(6), 1751-63.

Pourakbari, B., Mamishi, S., Benvari, S., & Mahmoudi, S. (2019). Comparison of the QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube interferon-γ release assays: A systematic review and meta-analysis. *Advanced Medical Science, 64*(2), 437-43

Sester, M., Sotgiu, G., Lange, C., Giehl, C., Girardi, E., Migliori, GB., Bossink, A., Dheda, K., Diel, R., Dominguez, J., Lipman, M., Nemeth, J., Ravn, P., Winkler, S., Huitric, E., Sandgren, A., & Manissero, D. (2011). Interferon-γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, *37*(1), 100–11.

Sester, M., Van Leth, F., Bruchfeld, J., Bumbacea, D., Cirillo, DM., Dilektasli, AG., Domínguez, J., Duarte, R., Ernst, M., Eyuboglu, FO., Gerogianni, I., Girardi, E., Goletti, D., Janssens, JP., Julander, I., Lange, B., Latorre, I., Losi, M., Markova, R., Matteelli, A., Milburn, H., Ravn, P., Scholman, T., Soccal, PM., & Straub, M., (2014). Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients. A TBNET study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *190*(10), 1168–76.

Sotgiu, G., Saderi, L., Petruccioli, E., Aliberti, S., Piana, A., Petrone, L., & Goletti D. (2019). QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta analysis. *Journal of Infection, 79*(5), 444-53.