干扰素- γ 释放试验在结核病诊断中的价值

王睿, 施焕中*

首都医科大学附属北京朝阳医院呼吸与危重症医学科, 北京市呼吸疾病研究所, 北京 100020

* 联系人, E-mail: shihuanzhong@sina.com

收稿日期: 2014-08-06; 接受日期: 2014-08-26; 网络版发表日期: 2015-03-04

doi: 10.1360/N052014-00208

结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test, TST)是用于检测潜伏结核感染(latent tuberculosis infection, LTBI)的传统方法. 自从干扰素- γ 释放试验(interferon- γ release assay, IGRA)进入临床应用之后大有取代 TST 之势. IGRA 是在体外检测 T 细胞经结核特异性抗原刺激之后产生和释放干扰素- γ 能力的免疫学技术, 藉此判断细胞介导的免疫反应. 国际上广泛使用的 IGRA 有 2 种, 即 4 澳大利亚产的 QuantiFERON-TB Gold In-Tube(QFT-GIT)和英国产的 T-SPOT.TB. 目前在我国各地医院应用最为普遍的是 T-SPOT.TB, 收费金额根据地区不同, 一般为 600~800 元人民币不等.

TST 是迟发型细胞超敏反应, 当机体被结核菌或卡介苗致敏后, 再次遭受到抗原入侵时, 引起变态反应性炎症, 其阳性表现为在结核菌素注射部位形成硬结甚至发生水泡、坏死. IGRA 是采用结核分枝杆菌特有的 2 种抗原 ESAT-6 和 CFP-10 刺激受检者全血或外周血单个核细胞使 T 淋巴细胞产生大量干扰素- γ , 然后用酶联免疫吸附法或酶联免疫斑点法检测干扰素- γ 浓度或计数分泌干扰素- γ 细胞的方法. QFT-GIT 和 T-SPOT.TB 2 种检测方法的原理类似, 但阳性判断标准截然不同. QFT-GIT 判断标准为, 结核抗原值减去阴性对照的值大于等于 0.35 IU/mL, 且差值大于等于阴性对照值的 25%为阳性. T-SPOT.TB 判断标准为, 任一检测孔达到以下标准即可判定为阳性: (i) 空白对照孔的斑点数小于 5 个, 检测孔斑点数减去空白对照孔斑点数大于或等于 6 个; (ii) 空

白对照孔的斑点数大于或等于 6 个, 检测孔的斑点数必须大于空白对照孔斑点数的 2 倍.

全国各地较大型规模以上的医院基本都开展了 IGRA 项目, 然而很多人对于该项目的应用范围和临床价值缺乏正确认识, 甚而只要看到 IGRA 阳性结果即不考虑临床实际和可能便给予抗结核治疗. 鉴于国内迄今为止尚无一关于 IGRA 应用的前瞻性研究报告, 本文总结了几年来国外的相关资料, 旨在回答关于 IGRA 在临床应用的几个重要问题.

1 IGRA 诊断 LTBI 的价值

关于 IGRA 用于诊断 LTBI 的研究文献比较多, 在这方面的结论也比较成熟. Richeldi^[1]的综述认为, T-SPOT.TB 诊断 LTBI 的敏感度高于 TST, 而 QFT-GIT 诊断 LTBI 的敏感度与 TST 相似; 无论人群是否接种过卡介苗, T-SPOT.TB 和 QFT-GIT 在诊断 LTBI 的特异度方面均优于 TST. Menzies 等人^[2]在 2007 年发表的 1 篇纳入 8 项研究的 meta 分析论文中指出, IGRA 对于普通人群, 尤其是曾经接种过卡介苗的人群诊断 LTBI 具有较高的特异度; 但和 TST 相同, IGRA 的敏感度难以令人满意, 两者均不能区别 LTBI 和活动性结核病. 随后又有更多类似的研究论文陆续发表. Pai 等人^[3] 1 年之后更新了类似的 meta 分析, 该 meta 分析总共纳入 38 篇论文. 基于 22 项研究的结果表明, QFT-GIT 诊断 LTBI 的总体敏感度为 76%(95% 可信区间(confidence interval, CI): 75%~

引用格式: 王睿, 施焕中. 干扰素- γ 释放试验在结核病诊断中的价值. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 320-324

Wang R, Shi H Z. Value of interferon- γ release assays for diagnosing tuberculosis. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 320-324, doi: 10.1360/N052014-00208

80%); 基于 13 项研究的结果表明, T-SPOT.TB 的敏感度为 90%(95%CI: 86%~93%)^[3]. 直接比较的研究结果显示, QFT-GIT 和 T-SPOT.TB 的 CI 并无重叠, 即 T-SPOT.TB 诊断 LTBI 的敏感度优于 QFT-GIT.

有 7 项研究对 QFT-GIT 和 T-SPOT.TB 进行了头对头的比较, 其中 6 项研究表明, T-SPOT.TB 诊断 LTBI 的敏感度优于 QFT-GIT(相差 3%~25%), 只有 1 项研究表明两者大致相当^[3].

QFT-GIT 诊断 LTBI(6 项研究)的总体特异度高达 98%(95%CI: 96%~99%), 卡介苗接种与否对结果的影响不大. T-SPOT.TB 的特异度略低(6 项研究), 为 93%(95%CI: 86%~100%)^[3].

此外, TST 诊断 LTBI(20 项研究)的敏感度为 77%(95%CI: 71%~82%), 其在未接种卡介苗人群中(6 项研究)的特异度较高, 为 97%(95%CI: 95%~99%); 但在卡介苗接种人群中的特异度则非常低, 没有实际意义^[3]. 鉴于 IGRA, 尤其是 QFT-GIT 的特异度较高, 其在卡介苗接种人群中的应用价值更大, 尤其是在因为婴幼儿时期就接种卡介苗导致 TST 特异度明显降低的国家和地区更有价值^[4].

整体而言, IGRA 和 TST 在诊断 LTBI 的应用价值大致相当, 在某些情况下前者的诊断效率较后者略胜一筹. 尽管两者都有助于诊断 LTBI, 但是两者诊断的一致性很差. Mancuso 等人^[5]的研究对 1781 名新兵同时进行了 QFT-GIT, T-SPOT.TB 和 TST 检测, 其中 88 人出现了至少 1 项阳性, 仅 10 人(11.4%)3 项检测均呈阳性. 说明其结果都不足以供单独应用, 在决定诊治方案之前进行仔细的临床评估(尤其是注重风险评估)是极其重要的^[6].

2 IGRA 诊断活动性结核病的价值

尽管有 2 篇 meta 分析指出, IGRA 对于诊断儿童肺结核的敏感度具有一定参考价值, 但人们普遍不能接受 IGRA 可单独用于诊断活动性结核病这一说法^[7,8]. 在南非进行的 1 项募集到 491 例痰涂片阴性疑为肺结核患儿的研究中, 结合临床资料、胸片以及 TST 结果诊断肺结核的曲线下面积为 85%(95%CI: 80%~90%). 该研究最重要的价值在于发现, T-SPOT.TB 相对于临床资料、胸片以及 TST 的综合判断价值而言, 并没有增加额外的诊断价值^[9]. 换言之, T-SPOT.TB 对于活动性肺结核的诊断价值不大.

Sester 等人^[10]在 2011 年发表的一篇 meta 分析共纳入 27 篇论文, 基于 18 篇关于外周血 IGRA 和 TST 的研究表明, T-SPOT.TB 诊断活动性结核病总体的敏感度和特异度分别为 81%(95%CI: 78%~81%)和 59%(95%CI: 56%~62%); QFT-GIT 总体的敏感度和特异度分别为 80%(95%CI: 75%~84%)和 79%(95%CI: 75%~82%), 虽然 IGRA 诊断活动性结核敏感度高于 TST, 但特异度较低, 会导致部分患者被误诊为活动性结核. 同期一项涉及 27 项来自中低收入国家的诊断性试验 meta 分析中, Metcalfe 等人^[11]报道在疑为结核病的成人患者中, T-SPOT.TB 诊断活动性结核病(6 项研究)总体的敏感度和特异度分别为 83%(95%CI: 63%~94%)和 61%(95%CI: 40%~79%); QFT-GIT(8 项研究)总体的敏感度和特异度分别为 69%(95%CI: 52%~83%)和 52%(95%CI: 41%~63%). 无论是 HIV 感染者还是非 HIV 感染者, IGRA 的诊断效率与 TST 相比较均无优势. 这些资料清楚地表明, 在中低收入国家, IGRA 和 TST 一样对于诊断成人活动性结核病没有任何价值^[11]. 另有研究指出, IGRA 较低的阳性预测值限制其在中低收入国家成为临床常规检测活动性结核的手段^[12]. 实际上, 世界卫生组织专家组基于现有的证据明确指出, 在中低收入国家不能以 IGRA 代替常规的微生物诊断方法用于肺结核和肺外结核的诊断^[13].

另一方面, 有研究指出, IGRA 阳性结果较 TST 阳性结果能更准确地预测 LTBI 进展为活动性结核病^[14], 但这一结论未能得到 meta 分析的支持. 一项涉及 26680 例患者的 meta 分析显示, IGRA 和 TST 对于活动性结核病的发生均无良好的预测价值, 尽管某些特定人群中检测 IGRA 的确能够减少给予预防性抗结核治疗的病例数^[15].

IGRA 阳性结果与活动性结核病的发生存在一定相关关系, 但其相关性只是弱到中等程度, 相对风险比一般为 2~3. 应该注意到, 在开展这些研究的发达国家中, 结核的发病率(包括 IGRA 阳性人群)是相当低的. 实际上, 大多数 IGRA 阳性个体在随访期间不会发展成为活动性结核病.

3 IGRA 在血液外其他体液标本中的应用

当痰涂片检测抗酸染色阴性时, 临床很难对肺结核进行快速的明确诊断. 为此, Jafari 等人^[16]于

2006 年收集了 12 名痰涂片阴性活动性肺结核患者的支气管肺泡灌洗液检测 IGRA, 另外 25 名痰涂片阴性的结节病、肺炎、肺癌、隐球菌肺炎、痰栓、类风湿关节炎的患者作为对照, 结果显示, 支气管肺泡灌洗液 IGRA 诊断活动性肺结核的敏感度和特异度均为 100%。但此研究纳入的男性患者明显多于女性, 活动性结核患者年龄明显小于对照组, 所以不能排除年龄、性别对肺泡灌洗液中单个核细胞免疫应答的影响; 而且, 此研究样本量小, 需要大样本量的研究进一步证实。Jafari 等人^[17]于 2009 年进一步进行了相关研究, 结果显示, 347 名患者中 71 例(20.4%)诊断为活动性结核。在其余 276 例患者中, 127 例(40.6%)外周血 IGRA 检测为阳性, 考虑为潜伏结核感染。支气管肺泡灌洗液 IGRA 诊断活动性肺结核的敏感度和特异度分别为 91%和 80%, 优于外周血 IGRA 和 TST; 此外, 支气管肺泡灌洗液 IGRA 的检测结果不受既往结核病史影响。也应该注意到, 假阴性和假阳性分别达到 9%和 20%, 因此, 在实际工作中应用支气管肺泡灌洗液 IGRA 诊断肺结核的效率并非人们所预期的那样高。

结核性胸膜炎是仅次于肺结核的第二常见结核病, 如不借助于内科胸腔镜则确诊甚为困难。可溶性指标中的干扰素- γ 及腺苷脱氨酶诊断结核性胸膜炎的灵敏度和特异度均比较高, 目前已用于临床诊断结核性胸膜炎, 具有良好的参考价值^[18,19]。结核性胸腔积液中炎症细胞以 $CD4^+$ T 细胞为主, 其中 $CD4^+CD69^+$ T 细胞系结核特异性的 Th1 细胞, 有望用于结核性胸膜炎的诊断^[20]。理论上, IGRA 用于结核性胸膜炎的诊断应该具有很高的诊断效率, 至少与检测干扰素- γ 浓度具有相似度敏感度和特异度, 但实际情况并非如此^[21]。

本研究组曾对所有探讨 IGRA 诊断结核性胸膜炎的英文文献进行系统回顾, 结果发现, 胸腔积液 IGRA 的敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比、阳性预测值、阴性预测值、以及诊断优势比分别为 0.75, 0.82, 3.49, 0.24, 0.85, 0.70 和 19.04; 外周血 IGRA 的上述指标分别为 0.80, 0.72, 2.86, 0.28, 0.78, 0.74 和 11.06^[21]。可以看出, 采用胸腔积液 IGRA 诊断结核性胸膜炎, 约 20%的非结核患者将被误诊而接受抗结核治疗, 而约 25%的患者则将被漏诊。因此, IGRA 用于诊断结核性胸膜炎在临床实际工作中是没有应用价值的。

应用 IGRA 诊断结核性腹膜炎的情况与此类似。来自韩国的 2 项小样本研究表明, 结核性腹膜炎和非

结核性腹膜炎患者腹腔积液与外周血 IGRA 检测值多有重叠, 整体而言虽然特异度较高, 但终因敏感度过低而限制了其实际应用的价值^[22,23]。

Patel 等人^[24]研究了脑脊液 IGRA 对于诊断结核性脑膜炎的价值, 结果表明, 脑脊液 IGRA 将结核性脑膜炎从非结核性脑膜炎区分开的敏感度为 58% (95%CI: 41%~74%), 特异度为 94% (95%CI: 83%~99%)。也就是说, 脑脊液 IGRA 阴性结果不能排除诊断, 而阳性结果则对于确定诊断有较好的参考作用, 但要注意, 将会有 6%的假阳性结果。其他研究也得到类似结论, 最后的诊断还必须依赖于临床资料和病原学检测^[25-27]。

4 IGRA 在免疫缺陷人群中的应用

免疫缺陷人群包括人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染、免疫相关疾病、接受肿瘤坏死因子抑制剂治疗、终末期肾脏疾病接受透析、恶性肿瘤、以及接受器官移植的患者等存在 LTBI 时发展为活动性结核病的风险大大增加^[28], 及早治疗 LTBI 能够减少他们进展为活动性结核病的机率。问题在于, 绝大多数免疫缺陷的患者都曾接受过复杂的治疗用药, 使得经验性治疗 LTBI 很难执行, 这种情况因为 TST 通常表现为假阴性而变得更为复杂^[29]。因此, 找到更好的技术手段尽早甄别出免疫缺陷人群中的 LTBI 患者尤为重要。

遗憾的是, 现在的证据并不支持将 IGRA 用于甄别免疫缺陷人群中的 LTBI 患者, 因为与 TST 相比较, IGRA 全无优势, 即 IGRA 基本上没有可能代替 TST 用于检测免疫缺陷人群中的 LTBI 患者^[30,31]。不过, 也有一些情况值得注意, Leidl 等人^[32]的研究指出, TST 和 QFT-GIT 的阳性率与外周循环中 $CD4^+$ T 细胞数量呈负相关($P<0.01$), 而外周循环中 $CD4^+$ T 细胞数量对 T-SPOT.TB 的阳性率无明显影响($P=0.46$), 说明 T-SPOT.TB 较少受到 HIV 感染患者 LTBI $CD4^+$ T 细胞减少的干扰。总而言之, T-SPOT.TB 具有较高的特异性, 说明其在评价伴有免疫缺陷的高风险人群中 LTBI 的价值更大。

5 IGRA 在评价抗结核治疗中的效用

活动性结核病通过有效的抗结核治疗后, 结核

杆菌载量下降, 效应 T 细胞数量会随之减少, 所以理论上 IGRA 结果应从阳性转变为阴性, 但临床实践中发现, IGRA 结果转阴率非常低^[33]. Chiappini 等人^[33]在 2012 年发表的一篇 meta 分析中指出, T-SPOT.TB(3 项研究)在结核病患者抗结核治疗后转阴率为 5.71%~13.93%, QFT-GIT(7 项研究)在结核病患者抗结核治疗后转阴率为 14.28%~41.89%, 说明 IGRA 在评价抗结核治疗方面的作用有限.

近期又有研究得出了类似的结论. Adetifa 等人^[34]的研究将 211 名 LTBI 患者随机分为 2 组, 其中试验组($n=105$)给予异烟肼抗结核治疗 6 个月, 对照组($n=106$)给予服用安慰剂, 治疗结束后行 T-SPOT.TB 检测, 试验组 52(49.5%)名患者阳性, 对照组 60(56.6%)名患者阳性, 两组无显著性差异, 说明 T-SPOT.TB 不能作为评价抗结核治疗的生物学指标. Denkinger 等人^[35]的研究对 149 名活动性结核患者进行 QFT-GIT 检测, 其中 133(89%)名患者阳性, 给予抗结核治疗后复测 QFT-GIT, 仅有 17(13%)名患者

QFT-GIT 结果由阳性转变为阴性, 同样说明 QFT-GIT 对评价抗结核治疗价值不大.

必须强调的是, 结核病的确诊必须依赖于结核杆菌微生物学检测的阳性结果. 免疫学检测如 IGRA 等并非直接检测结核杆菌的存在, 结核阳性结果仅表明个人对于最近或者既往的结核杆菌感染存在细胞免疫反应.

综上所述, IGRA 在结核的诊断效率和评价治疗效果方面与 TST 大致相当, 仅在某些情况下前者略优于后者. 应该注意到, 关于 IGRA 的研究论文大都是来自发达国家的临床研究报告, 这些国家的结核负担低, 研究结果肯定与我国的实际情况有很大差异. 在我国结核负担仍然较高, 但在结核控制方面与低收入国家有很大差异, 国内对于 IGRA 应用的报道很有限, 因此, 迫切需要一项大规模的前瞻性研究来评价 IGRA 在我国诊断结核病的确切价值, 如最终结论与国外研究相似, 需重新考虑这种检测方法在我国的应用价值.

参考文献

- Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174: 736–742
- Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*, 2007, 146: 340–354
- Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*, 2008, 149: 177–184
- Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10: 1192–1204
- Mancuso J D, Mazurek G H, Tribble D, et al. Discordance among commercially available diagnostics for latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185: 427–434
- Herrera V, Perry S, Parsonnet J, et al. Clinical application and limitations of interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection. *Clin Infect Dis*, 2011, 52: 1031–1037
- Machingaidze S, Wiysonge C S, Gonzalez-Angulo Y, et al. The utility of an interferon gamma release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30: 694–700
- Mandalakas A M, Detjen A K, Hesselning A C, et al. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15: 1018–1032
- Ling D I, Nicol M P, Pai M, et al. Incremental value of T-SPOT.TB for diagnosis of active pulmonary tuberculosis in children in a high-burden setting: a multivariable analysis. *Thorax*, 2013, 68: 860–866
- Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*, 2011, 37: 100–111
- Metcalfe J Z, Everett C K, Steingart K R, et al. Interferon-gamma release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis*, 2011, 204: S1120–S1129
- Kang Y A, Lee H W, Hwang S S, et al. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest*, 2007, 132: 959–965
- WHO. Strategic and Technical Advisory Group for Tuberculosis (STAG-TB): report of the tenth meeting. Geneva: World Health Organization, 2010. http://www.who.int/tb/advisory_bodies/stag_tb_report_2010.pdf
- Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for progression

- from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. *Chest*, 2012, 142: 63–75
- 15 Rangaka M X, Wilkinson K A, Glynn J R, et al. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12: 45–55
 - 16 Jafari C, Emst M, Kalsdorf B, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174: 1048–1054
 - 17 Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, et al. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a tuberculosis network European trialsgroup study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180: 666–673
 - 18 Jiang J, Shi H Z, Liang Q L, et al. Diagnostic value of interferon-gamma in tuberculous pleurisy: a metaanalysis. *Chest*, 2007, 131: 1133–1141
 - 19 Liang Q L, Shi H Z, Wang K, et al. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir Med*, 2008, 102: 744–754
 - 20 Tong Z H, Shi H Z. Subpopulations of helper T lymphocytes in tuberculous pleurisy. *Tuberculosis (Edinb)*, 2013, 93: 279–284
 - 21 Zhou Q, Chen Y Q, Qin S M, et al. Diagnostic accuracy of T-cell interferon-gamma release assays in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respirology*, 2011, 16: 473–480
 - 22 Kim S H, Cho O H, Park S J, et al. Diagnosis of abdominal tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells. *J Infect*, 2009, 59: 409–415
 - 23 Cho O H, Park K H, Park S J, et al. Rapid diagnosis of tuberculous peritonitis by T cell-based assays on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells. *J Infect*, 2011, 62: 462–471
 - 24 Patel V B, Singh R, Connolly C, et al. Cerebrospinal T-cell responses aid in the diagnosis of tuberculous meningitis in a human immunodeficiency virus- and tuberculosis-endemic population. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182: 569–577
 - 25 Kim S H, Chu K, Choi S J, et al. Diagnosis of central nervous system tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15: 1356–1362
 - 26 Kim S H, Cho O H, Park S J, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by T cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Clin Infect Dis*, 2010, 50: 1349–1358
 - 27 Park K H, Cho O H, Lee E M, et al. T-cell-based assays on cerebrospinal fluid and PBMCs for rapid diagnosis of TB meningitis in non-HIV patients. *Eur Respir J*, 2012, 39: 768–770
 - 28 Antonucci G, Girardi E, Raviglione M C, et al. Risk factors for tuberculosis in HIV-infected persons. A prospective cohort study. The Gruppo Italiano di Studio Tubercolosi e AIDS (GISTA). *JAMA*, 1995, 274: 143–148
 - 29 Huebner R E, Schein M F, Bass J B Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis*, 1993, 17: 968–975
 - 30 Richeldi L, Losi M, D'Amico R, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest*, 2009, 136: 198–204
 - 31 Redelman-Sidi G, Sepkowitz K A. IFN- γ release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 188: 422–431
 - 32 Leidl L, Mayanja-Kizza, H, Sotgiu G, et al. Relationship of immunodiagnostic assays for tuberculosis and numbers of circulating CD4⁺ T-cells in HIV infection. *Eur Respir J*, 2010, 35: 619–626
 - 33 Chiappini E, Fossi F, Bonsignori F, et al. Utility of interferon- γ release assay results to monitor anti-tubercular treatment in adults and children. *Clin Ther*, 2012, 34: 1041–1048
 - 34 Adetifa I M, Ota M O, Jeffries D J, et al. Interferon- γ ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187: 439–445
 - 35 Denking C M, Pai M, Patel M, et al. Gamma interferon release assay for monitoring of treatment response for active tuberculosis: an explosion in the spaghetti factory. *J Clin Microbiol*, 2013, 51: 607–610