

文章编号: 1007-4287(2010)12-2065-04

# $\gamma$ 干扰素释放分析 T-SPOT.TB 在诊断结核感染中的研究进展

刘晓清\*, 张丽帆

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 感染内科, 北京 100730)

结核病是世界上单一致病菌引起死亡最多的疾病。据 WHO 估计, 全球有约 20 亿人感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), 每年有约 200 万人死于结核<sup>[1]</sup>。中国是 22 个结核病高负担国家 (占全球结核病例的 80%) 之一, 早期准确诊断结核病对控制结核疫情至关重要<sup>[2]</sup>。结核病的临床表现多样, 尤其是肺外结核病变往往十分隐匿, 传统的诊断方法有很多不足, 抗酸染色检出率低, 结核分枝杆菌培养需时较长, 组织病理学检查常为有创性。结核菌素皮试 (tuberculin skin test, TST) 是长期以来用以快速诊断结核感染的唯一手段。然而 TST 存在诸多缺陷: 结核菌素纯蛋白衍生物 (purified protein derivatives, PPD) 是 200 多种蛋白的混合物, 其中很多是非结核分枝杆菌及卡介苗 (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG) 的共同抗原成分, 在普遍接种 BCG 的地区造成非常高的“假阳性”率, 而在易受结核感染的免疫力低下人群中, 其敏感性低, 存在很高的“假阴性”率<sup>[3-4]</sup>。近年来, T-SPOT.TB 作为一种新的诊断结核感染的免疫学方法已经越来越广泛地被认可并应用于临床。它是应用酶联免疫斑点技术 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT) 检测机体内经结核分枝杆菌特异性抗原刺激后释放  $\gamma$  干扰素的特异性 T 细胞数量诊断结核感染。

## 1 T-SPOT.TB 研究过程

**1.1 结核分枝杆菌特异性抗原的发现** 1996 年, Mahairas 等<sup>[5]</sup> 学者通过将结核分枝杆菌和牛分枝杆菌与 BCG 比较, 首先发现了在卡介苗基因中缺失的 3 段差异区 (region of difference, RD), 总长约 30 kb, 命名 RD1-RD3。随后, 更多学者证实了这些差异区的存在, 并发现了除 RD1-RD3 之外的 13 个差异区, 依次命名为 RD4-RD16。RD1-RD16 包含 129 个开放读码框。其中 RD1 区被证实仅存在于致病性分枝杆菌中, 在 BCG 及多数环境分枝杆菌中均缺失。

RD1 区全长 9.5 kb, 共包括 9 个编码基因 rv3871-rv3879c, 分别编码相应蛋白。6 KD 早期分泌靶向抗原 (early secreting antigen target-6, ESAT-6) 是 RD1 区发现较早的小分子分泌型蛋白, 由 rv3875 基因编码, 全长 285 个碱基对, 编码 95 个氨基酸。1998 年 Berthet<sup>[6]</sup> 等在研究 esat6 基因表达调控机制时, 发现了 lhp 基因, lhp 基因即 rv3874 基因, 位于 esat6 基因上游 34bp 处, 和 esat6 基因处于同一操纵单元。编码 100 个氨基酸, 蛋白分子量大小约为 10kD, 由于其基因产物在早期培养滤液中出现, 因此称为 10KD 培养滤液蛋白 (culture filtrate protein-10, CFP-10)。esat6 基因和 cfp10 基因由同一操纵子调控, 进行协同转录。研究证实结核 RD1 区编码抗原 ESAT-6 和 CFP-10 具有良好的免疫活性, 能够用于诊断结核感染。

**1.2 T-SPOT.TB 的原理** 结核分枝杆菌感染机体后, 引起固有免疫及获得性免疫, 特异性的中央型记忆细胞 (CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) 和效应型记忆细胞 (CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>-</sup>) 在机体中长期存在<sup>[7-9]</sup> 当再次遇到抗原刺激时, 能迅速活化增殖, 释放  $\gamma$  干扰素。ELISPOT 技术是近 20 年发展起来的检测抗原特异性 T 细胞的技术, 是目前最敏感的检测抗原特异性 T 细胞的方法之一, 可以检测出 1/100 000—1/50 000 外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中经某种抗原刺激后释放某种细胞因子的细胞, 经过酶联显色后, 通过 ELISPOT 分析系统 (ELISPOT Reader) 对斑点进行计数, 1 个斑点代表 1 个细胞, 从而计算出抗原特异性细胞的数量。T-SPOT.TB 是应用 ELISPOT 技术检测经结核 RD1 区编码抗原 ESAT-6 和 CFP-10 肽段库刺激后释放  $\gamma$  干扰素的特异性 T 细胞数量诊断结核感染的方法。2004 年 T-SPOT.TB 在英国及欧洲上市, 2008 年通过美国 FDA 认证。

**1.3 T-SPOT.TB 结果判断** T-SPOT.TB 的实验结果清晰, 易于判断。实验设有空白对照、阳性对照以及以 ESAT-6 和 CFP-10 肽段库作为刺激原的两个实

\* 通讯作者

验孔。ELISPOT Reader 计数斑点, 空白对照孔内斑点数小于 10 且阳性对照孔内斑点数大于 20 时视为实验有效。当空白对照孔内斑点数小于 6 时, 任一实验孔斑点数减去空白对照后大于等于 6, 结果判为阳性; 当空白对照孔内斑点数大于 6 时, 任一实验孔斑点数大于空白对照的 2 倍, 结果判为阳性。T-SPOT.TB 的实验结果用每百万个外周血单个核细胞中斑点形成细胞 (spot-forming cell, SFC) 的个数来描述, 即 SFC/10<sup>6</sup>PBMC。

## 2 T-SPOT.TB 诊断结核感染研究进展

### 2.1 外周血 T-SPOT.TB 在诊断活动性结核病中的应用

Pai M 等<sup>[10]</sup>对 13 项研究的 726 例受试者进行 meta 分析, 绝大多数是结核培养阳性、HIV 阴性的成年人, 分析表明 T-SPOT.TB 的综合敏感性为 90%。在免疫力低下的人群中, T-SPOT.TB 依然能够维持较高的敏感性。Chapman 等<sup>[11]</sup>研究显示 39 例 HIV 阳性的结核患者中 T-SPOT.TB 的敏感性为 90%, 而 PPD 皮试的阳性率仅为 72%。Richeldi L<sup>[12]</sup>等对 331 例免疫力低下患者的 (120 例肝移植患者, 116 例 HIV 感染者, 95 例恶性血液病患者) 研究表明 T-SPOT.TB 的阳性率明显高于 TST ( $P < 0.001$ ), 能够更加敏感地检测出潜伏性结核感染。Chung WK<sup>[13]</sup>等在韩国 167 名血液透析患者的研究中得出了同样的结论。在类风湿性关节炎的患者中, T-SPOT.TB 诊断潜伏性结核感染的特异性为 87%—90%, 阴性预测值高达 94.4%—100%, 与 TST 相比, 能够更加准确地排除结核感染<sup>[14]</sup>。Liebeschutz 等<sup>[15]</sup>在 293 例怀疑结核的非洲儿童的研究显示, 对于确诊结核或高度怀疑结核的病例, T-SPOT-TB 的阳性率为 83%, PPD 皮试的阳性率为 63%, 两者差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )。数据分析显示年龄、HIV 感染状态和营养不良的严重程度对 T-SPOT-TB 结果无影响, 但均能导致 PPD 皮试结果的显著差异。Nicol MP 等<sup>[16]</sup>在 2009 年发表了对 243 例可疑结核的婴幼儿的研究结果, 这些婴幼儿平均年龄为 18 个月, 在经痰或胃灌洗液结核菌培养阳性确诊的病例中, T-SPOT-TB 的阳性率仅为 50%, 而年龄大于 12 个月的幼儿与 12 个月之内的婴儿相比, 前者阳性率明显增高, 提示在婴儿中诊断结核感染会降低 T-SPOT-TB 的敏感性。

在肺外结核的诊断中, T-SPOT.TB 具有较高的敏感性。Ferrara 等<sup>[17]</sup>和 Lee 等<sup>[18]</sup>报道的两个前瞻性研究中 T-SPOT.TB 的阳性率为 100%。Kim 等<sup>[19]</sup>随诊 72 例怀疑肺外结核患者的前瞻性研究显示 T-

SPOT.TB 和 PPD 诊断活动性肺外结核的敏感性分别为 94% 和 47%, 二者比较差异具有显著性 ( $P < 0.001$ )。47% 的随诊对象合并有导致免疫低下的情况, 包括 HIV 感染、肿瘤、移植、糖尿病以及自身免疫病等, 可能是导致 PPD 皮试的阳性率显著降低的原因。Liao CH<sup>[20]</sup>等的研究显示, T-SPOT.TB 在台湾 89 例肺外结核患者中具有较高的敏感性和特异性, 尤其对于结核性脑膜炎, 结核性心包炎, 肠结核和淋巴结核, 诊断的敏感性达到 95% 以上。霍霏霏<sup>[21]</sup>等在 31 例细菌学或组织学确诊的肺外结核患者的研究显示, T-SPOT.TB 的敏感性为 93.5%。

T-SPOT.TB 特异性评价的研究都在结核低流行区进行。Pai M 等<sup>[10]</sup>的系统分析中纳入了 6 项研究, 其中 5 项中的受试者都常规地接受 BCG 免疫。6 项研究共包括 290 名受试者, 93% 为无结核接触史的健康成年人, 其综合特异性为 93%。

### 2.2 浆膜腔积液/脑脊液 T-SPOT.TB 在诊断结核性浆膜炎/脑膜炎中的应用

结核性浆膜炎的免疫反应机制研究多集中于结核性胸膜炎, 胸腔积液中各种细胞因子如 IFN- $\gamma$ 、IL-2 等水平均显著高于外周血, 病变局部呈免疫病理学的隔室化反应 (Compartmentalization)<sup>[22]</sup>。

体外试验证实, 胸膜间皮细胞在结核性胸膜炎的免疫反应中起重要作用, 结核性胸膜炎患者胸膜间皮细胞高表达细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), ICAM-1 及其配体淋巴细胞功能相关抗原-1 (lymphocyte function association antigen-1, LFA-1) 相互作用, 介导了活化的淋巴细胞向胸膜腔的迁移<sup>[23]</sup>。

在结核低流行国家, Wilkinson KA<sup>[24]</sup>于 2005 年最先在英国进行了胸腹水中单个核细胞 ESAT-6—ELISPOT 检测诊断结核病的研究, 结果证实了胸腹水单个核细胞 ELISPOT 检测诊断结核性胸膜炎/腹膜炎的可行性; 同时研究证实胸腹水 ELISPOT 检测到的释放  $\gamma$  干扰素的特异性 T 细胞数量是外周血中的 15 倍左右, 而且对于不同肽段的反应谱更加广泛。Losi M<sup>[25]</sup>等的研究也显示胸水 T-SPOT.TB 的结果与外周血相比具有更高的敏感性和特异性。张丽帆<sup>[26]</sup>等在我国进行的初步研究同样显示胸腹水检测的斑点形成细胞数远远高于静脉血, 甚至高达数十倍, 具有更高的敏感性。2007 年, 韩国 Kim SH<sup>[27]</sup>等首先评价了脑脊液 T-SPOT.TB 诊断结核性脑膜炎的敏感性, 并与外周血的结果进行比较。结果显示检测脑脊液和外周血的敏感性分别为 75% 和

91%。Kösters等<sup>[28]</sup>和Thomas等<sup>[29]</sup>的研究均表明脑脊液 T-SPOT.TB 能够早期快速地诊断结核性脑膜炎。张丽帆<sup>[26]</sup>等研究显示对于结核性脑膜炎,外周血 T-SPOT.TB 较脑脊液更为敏感,但脑脊液 T-SPOT.TB 有可能更为灵敏地检测疗效。

**2.3 活动性结核与潜伏性结核感染的鉴别** 大量的研究显示外周血 T-SPOT.TB 能够敏感地诊断活动性结核病,但现有的部分研究显示它在鉴别活动性结核病与潜伏性结核感染和既往陈旧性结核方面作用有限。因此,在结核高流行地区如中国,较高的潜伏性结核感染率可能降低外周血 T-SPOT.TB 协助诊断活动性结核病的临床应用价值。机体免疫力低下时,免疫系统与结核菌之间的平衡被打破,结核菌得以大量复制,从而导致结核活动。结核菌数量增加时,被活化的抗原特异性效应 T 细胞的数量也会随之增加,在 T-SPOT.TB 中反映为斑点数目的增加。基于上述原理,斑点形成细胞的数量有可能存在一个界值用来鉴别活动性结核和潜伏性结核感染<sup>[30]</sup>。

Janssens等<sup>[31]</sup>研究了 T.SPOT-TB 在鉴别潜伏结核和活动性结核中的作用,他们将潜伏结核定义为 T.SPOT-TB 阳性的无症状结核接触者。活动性结核患者在治疗 2 周内进行 T.SPOT-TB 测试,减小了治疗对检测的影响。T-SPOT.TB 结果在活动性结核患者中显著高于潜伏结核人群 ( $P < 0.0001$ )。受试者工作特征曲线分析显示以 49.5 SFC 为分界值鉴别活动性与潜伏性结核感染,其敏感性为 83%,特异性为 74%,但两者间的交叉较大。Chee等<sup>[32]</sup>对 230 例培养阳性活动性结核患者和 183 例结核接触者进行了 T-SPOT.TB 检测,在 ESAT-6 肽段库中,活动性结核患者与结核接触者的斑点形成细胞数分别为 108 vs. 40 SFC/106PBMC ( $P < 0.001$ ),在 CFP-10 肽段库中,分别为 148 vs. 52 SFC/106PBMC ( $P < 0.001$ ),但两者同样存在广泛重叠。Hinks TS<sup>[33]</sup>等的研究显示活动性结核患者与潜伏性结核感染者相比,前者对特异性抗原的反应谱更广而且反应强度更大。以上的研究结论在动物模型中也得到证实<sup>[34]</sup>。综上所述,T-SPOT.TB 的斑点数虽然并不精确地与结核活动程度成正相关,但仍然存在着结核活动程度越高斑点数越多的趋势。此外,基于结核抗原特异性的效应 T 细胞有向病变部位聚集的特点,浆膜腔积液/脑脊液 T-SPOT.TB 能够更加准确地反映结核感染的状态,与外周血 T-SPOT.TB 联合应用,有望鉴别活动性结核病与潜伏性结核感染。

### 3 荧光 ELISPOT 技术在诊断结核感染中的应用前景

IL-2 与 IFN- $\gamma$  均为 Th1 细胞因子,参与结核分枝杆菌引起的细胞免疫。文献报道<sup>[35]</sup>,特异性 T 细胞 IL-2 与 IFN- $\gamma$  的分泌随结核感染状态的不同而有所变化,在活动性结核病患者中,以分泌 IFN- $\gamma$  以及 IFN- $\gamma$ /IL-2 的特异性 T 细胞为主;在抗结核治疗过程中,则转为以分泌 IFN- $\gamma$ /IL-2 的特异性 T 细胞为主;而在抗结核治疗结束后,则以分泌 IL-2 的特异性 T 细胞为主。Bisell<sup>[36]</sup>等应用 ELISA 方法检测经结核特异性抗原刺激后 IFN- $\gamma$  及 IL-2 的分泌。研究显示,在潜伏性结核感染者中,特异性 T 细胞在刺激 72 小时后分泌大量 IL-2,而在活动性结核患者中并未检测到 IL-2 的分泌,从而可鉴别诊断活动性结核病与潜伏性结核感染。Sargentini<sup>[37]</sup>等应用流式细胞术检测胞内因子 IFN- $\gamma$  和 IL-2 诊断结核感染,也显示潜伏性结核感染者分泌 IL-2 的特异性 T 细胞数量高于活动性结核病患者,提示 IL-2 有可能成为区分结核感染状态的分子标记。荧光 ELISPOT 技术在传统 ELISPOT 技术基础上发展起来。与传统检测相比,荧光 ELISPOT 技术能够在单细胞水平同时检测两种甚至多种细胞因子,且不会造成斑点混色无法识别。在保证高灵敏度的同时,大大提升了 ELISPOT 技术的应用价值。目前,国际上已有检测两种甚至多种细胞因子的荧光 ELISPOT 试剂盒,应用荧光 ELISPOT 技术有望了解结核感染状态,更准确诊断活动性结核病。

#### 参考文献:

- [1] Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Latent tuberculosis infection[J]. N Engl J Med. 2002, 347(23): 1860.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 2000年全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(2): 65.
- [3] Lee E, Holzman RS. Evolution and current use of the tuberculin test[J]. Clin Infect Dis. 2002, 34(3): 365.
- [4] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis[J]. Lancet. 2000, 356(9235): 1099.
- [5] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis[J]. J Bacteriol. 1996, 178(5): 1274.
- [6] Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10)[J]. Microbiology. 1998, 144: 3195.
- [7] Fritsch RD, Shen X, Sims GP, et al. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27[J]. J Immunol. 2005, 175(10): 6489.
- [8] Beverley PC. Primer: making sense of T-cell memory[J]. Nat Clin Pract Rheumatol. 2008, 4(1): 43.

- [9] Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design[ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(4): 247.
- [10] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update[ J ]. *Ann Intern Med*, 2008, 149(3): 177.
- [11] Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells[ J ]. *AIDS*, 2002, 16(17): 2285.
- [12] Richeldi L, Losi M, D'Amico R, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients[ J ]. *Chest*, 2009, 136(1): 198.
- [13] Chung WK, Zheng ZL, Sung JY, et al. Validity of interferon-gamma-release assays for the diagnosis of latent tuberculosis in haemodialysis patients[ J ]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 10.
- [14] Marques CD, Duarte AL, de Lorena VM, et al. Evaluation of an interferon gamma assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis[ J ]. *Rheumatol Int*, 2009, 11.
- [15] Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, et al. Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study[ J ]. *Lancet*, 2004, 364(9452): 2196.
- [16] Nicol MP, Davies MA, Wood K, et al. Comparison of T-SPOT, TB assay and tuberculin skin test for the evaluation of young children at high risk for tuberculosis in a community setting[ J ]. *Pediatrics*, 2009, 123(1): 38.
- [17] Ferrara G, Losi M, D'Amico R, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study[ J ]. *Lancet*, 2006, 367(9519): 1328.
- [18] Lee JY, Choi HJ, Park IN, et al. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection[ J ]. *Eur Respir J*, 2006, 28(1): 24.
- [19] Kim SH, Choi SJ, Kim HB, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell based assay for extrapulmonary tuberculosis[ J ]. *Arch Intern Med*, 2007, 167(20): 2255.
- [20] Liao CH, Chou CH, Lai CC, et al. Diagnostic performance of an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in extrapulmonary tuberculosis varies between different sites of disease[ J ]. *J Infect*, 2009, 0 et 9.
- [21] 霍霏霏, 张丽帆, 刘晓清. 价  $\gamma$  干扰素释放分析 T-SPOT.TB 在肺外结核诊断中的敏感性[ J ]. *中国医学科学院学报*, 2009, 31(4): 449.
- [22] 王敬萍, 刘东洋, 古淑香, 等. 胸液  $\gamma$ -干扰素和  $\alpha$ -肿瘤坏死因子检测对结核性胸膜炎诊断价值的探讨[ J ]. *中国防痨杂志*, 1999, 21(2): 91.
- [23] Souza MC, Penido C, Costa MF, et al. Mechanisms of T-lymphocyte accumulation during experimental pleural infection induced by *Mycobacterium tuberculosis* BCG[ J ]. *Infect Immun*, 2008, 76(12): 5686.
- [24] Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis[ J ]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(1): 184.
- [25] Losi M, Bossink A, Codecasa L, et al. Use of a T-cell interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy[ J ]. *Eur Respir J*, 2007, 30: 1173.
- [26] 张丽帆, 刘晓清. 胸腹水、脑脊液中结核分枝杆菌 RD1 基因编码抗原刺激后释放  $\gamma$  干扰素的特异性 T 细胞检测[ J ]. *中国医学科学院学报*, 2009, 31(4): 438.
- [27] Kim SH, Chu K, Choi SJ, et al. Diagnosis of central nervous system tuberculosis by T-cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells[ J ]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008, 15(9): 1356.
- [28] Kösters K, Nau R, Bossink A, et al. Rapid diagnosis of CNS tuberculosis by a T-cell interferon-gamma release assay on cerebrospinal fluid mononuclear cells[ J ]. *Infection*, 2008, 36(6): 597.
- [29] Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S, et al. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells[ J ]. *Int J Tuberc Lung*, 2008, 12(6): 651.
- [30] Andersen P, Doherty TM, Pai M. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted[ J ]? *Trends Mol Med*, 2007, 13(5): 175.
- [31] Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, et al. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis[ J ]. *Eur Respir J*, 2007, 30(4): 722.
- [32] Chee CB, Barkham TM, Khinmar KW, et al. Quantitative T-cell interferon-gamma responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active and latent tuberculosis[ J ]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2009, 28(6): 667.
- [33] Hinks TS, Dosanjh DP, Innes JA, et al. Frequencies of region of difference 1 antigen-specific but not purified protein derivative-specific gamma interferon-secreting T cells correlate with the presence of tuberculosis disease but do not distinguish recent from remote latent infections[ J ]. *Infect Immun*, 2009, 77(12): 5486.
- [34] Lin PL, Rodgers M, Smith L, et al. Quantitative comparison of active and latent tuberculosis in the cynomolgus macaque model[ J ]. *Infect Immun*, 2009, 77(10): 4631.
- [35] Millington KA, Innes JA, Hackforth S, et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load[ J ]. *J Immunol*, 2007, 178(8): 5217.
- [36] Biselli R, Mariotti S, Sargentini V, et al. Detection of interleukin-2 in addition to interferon-gamma discriminates active tuberculosis patients, latently infected individuals and controls[ J ]. *Clin Microbiol Infect*, 2010, 16(8): 1282.
- [37] Sargentini V, Mariotti S, Carrara S, et al. Cytometric detection of antigen-specific IFN-gamma/IL-2 secreting cells in the diagnosis of tuberculosis[ J ]. *BMC Infect Dis*, 2009, 23: 9:99.

(收稿日期: 2010-02-10)