

γ -干扰素释放试验在结核病诊断中的临床价值

周 政, 李建英, 韩 飞, 王文昕, 易兴鑫(重庆三峡中心医院, 重庆万州 404000)

【摘要】 目的 比较分析 γ -干扰素释放试验(IGRAs)、结核菌素皮肤试验(TST)、抗酸染色和培养在结核病患者中的诊断性能, 评价 IGRAs 用于结核感染诊断的临床价值。**方法** 用四种方法分别对 60 例肺结核患者、54 例非结核肺疾病患者和 35 例健康体检者进行检测, 以两两比较其诊断性能的差异。**结果** IGRAs 对肺结核病的诊断特异性为 89.9%, 灵敏度为 88.3% (53/60), 灵敏度显著高于 TST (66.7%)、抗酸染色 (31.7%) 和分枝杆菌培养 (46.7%), 而且对活动性肺结核的诊断灵敏度更是高达 93.8%。**结论** IGRAs 具有灵敏度高、特异性高、检测快速等特点, 是一种逐渐替代传统 TST 方法的结核诊断的新的辅助试验。

【关键词】 γ -干扰素释放试验; 结核菌素皮肤试验; 结核分枝杆菌; 结核感染; 肺结核

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.16.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)16-2213-03

Clinical value of interferon gamma release arrays for diagnosis of tuberculosis infection ZHOU Zheng, LI Jian-ying, HAN Fei, WANG Wen-xin, YI Xing-xin (Chongqing Three Gorges Central Hospital, Wanzhou, Chongqing 404000, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical value of interferon gamma release arrays(IGRAs) for diagnosis of tuberculosis infection by comparatively analyzing the diagnostic performances of IGRAs, tuberculin skin test (TST), acid fast stain and culture. **Methods** Respectively test 60 pulmonary tuberculosis patients, 54 non-tuberculosis pulmonary disease patients and 35 healthy subjects by four methods, and analyze the differences of diagnostic performances using a chi-square test. **Results** The diagnostic specificity of IGRAs was 89.9%, while sensitivity was 88.3%, which was significantly higher than those of other three methods. It was up to 93.8% for active pulmonary tuberculosis patients. **Conclusion** IGRAs is a new method for replacing TST in diagnosis of tuberculosis, as its high sensitivity, high specificity and short turn around time.

【Key words】 interferon gamma release arrays; tuberculin skin test; mycobacterium tuberculosis; tuberculosis infection; pulmonary tuberculosis

越来越多的学者开始关注结核病的诊断和治疗, 而结核分枝杆菌的实验室检测和药敏测定一直是研究的热点和难点。传统的检测方法如结核菌素皮肤试验(TST)、抗酸染色涂片镜检、分枝杆菌培养鉴定、结核菌核酸检测等方法由于其各自的局限性, 已逐渐不能完全满足临床实验室的需求, 临床急需一种灵敏度高、特异性高、报告时间短的新方法, 用于结核患者的诊断和鉴别诊断。随着免疫学和分子生物学的发展, 一种以 T 淋巴细胞免疫应答为基础的 γ -干扰素 (IFN- γ) 释放试验 (IGRAs) 逐渐被人们所认识。IGRAs 是一种新的辅助诊断结核病的方法, 它可以定性或定量检测出机体是否含有结核分枝杆菌的特异性记忆 T 细胞, 而这种 T 细胞对于机体是否感染结核分枝杆菌有着很强的指示性。本文旨在通过比较分析 IGRAs、TST、抗酸染色涂片镜检和分枝杆菌培养在结核病患者中的诊断性能, 初步评价 IGRAs 用于结核病诊断的临床价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 对象 选取 2012 年 1 月至 2013 年 8 月来本院就诊的肺疾病患者, 根据临床诊断分为肺结核组: 根据我国《肺结核诊断标准》(WS288-2008) 确诊为活动性肺结核患者 32 例、非活动性肺结核患者 28 例, 其中男 36 例, 女 24 例, 年龄 15~68 岁, 平均 (32.5 $\pm$ 28.4) 岁。非结核肺疾病组: 根据临床症状、体征、X 线胸片、CT、肺功能试验等检查, 确诊为肺炎患者 18 例、慢性阻塞性肺疾病 21 例、肺气肿 10 例、支气管扩张症 5 例, 合计

54 例, 其中男 32 例, 女 22 例, 年龄 20~75 岁, 平均 (46.3 $\pm$ 25.5) 岁。健康对照组: 35 例, 均来自于本院健康体检者, 其中男 18 例, 女 17 例, 年龄 18~22 岁, 平均 (20.2 $\pm$ 1.7) 岁。

1.2 实验方法

1.2.1 结核菌素皮肤试验 所有实验对象均做 TST 试验, 采用 Moutax 法, 在前臂的掌侧面皮内接种 0.1 mL (含 5 个结核菌素单位) 标准 PPD (购自成都生物制品研究所), 72 h 后检查反应结果, 测量硬结直径。若硬结直径大于或等于 10 mm, 则判定为 TST 试验阳性。

1.2.2 抗酸染色涂片 肺结核组患者就诊时被告知将做该试验, 取随机痰、夜间痰和第二日晨痰三个标本, 按《全国临床检验操作规程》(第三版) 进行涂片、抗酸染色 (购自珠海贝索生物技术有限公司) 和镜检。在 10 $\times$ 100 倍油镜下至少观察 100 个视野, 结核分枝杆菌呈红色, 其他细菌和细胞呈蓝色。按照 1984 年国内统一标准进行报告: 全视野 (或 100 个视野) 未找到抗酸菌报告“—”; 全视野发现 1~2 个时报告抗酸菌的个数; 全视野发现 3~9 个报告“+”; 全视野发现 10~99 个报告“++”; 每视野发现 1~9 个报告“+++”; 每视野发现 10 个以上报告“++++”。

1.2.3 分枝杆菌培养 以肺结核组患者的晨痰作分枝杆菌培养试验, 采用全自动快速结核菌培养系统 BACTEC MGIT 960 (购自美国 BD 公司) 及其配套试剂, 严格按仪器说明书进行操作。仪器自动判断报阳, 且经抗酸染色确认为阳性, 即为该标

本分枝杆菌培养阳性;若经 28 日培养仪器判断为阴性,但抗酸染色确认为阳性时,也报告该标本分枝杆菌培养阳性。

1.2.4 IGRAs 所有实验对象均做 IGRAs,在采集全血标本 2 h 内进行标本前处理。整个试验采用酶联免疫斑点试验(ELISPOT),试剂盒购自英国牛津免疫公司,其原理是用结核分枝杆菌特异性早期分泌靶向抗原 6(ESAT-6)和培养过滤蛋白(CFP-10)肽段分别和共同刺激 T 细胞产生免疫应答,再用 ELISPOT 法计数分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞的数量。试验严格按试剂说明书进行操作。首先用绿头管(肝素抗凝,BD 公司提供)采集受试者 4 mL 静脉血,在 4 h 内分离出外周血单个核细胞(PBMCs),然后用培养液调整至约 2.5×10^6 /mL 左右,加入到试剂盒的微孔板内。每例标本需要 4 个微孔板,分别加入培养液(空白对照)、植物血凝集素(阳性对照)、抗原 A(ESAT-6)和抗原 B(CFP-10),然后于 5% CO₂ 培养箱中孵育 16~20 h。第 2 天取出微孔板,磷酸盐缓冲液(PBS)洗脱,加入碱性磷酸酶标记的 γ -干扰素特异性抗体,4 ℃ 孵育 2 h,PBS 洗脱,以酶联斑点显色,计数斑点形成细胞(SFC)。当任一检测孔达到以下标准即可判定为阳性:(1)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;(2)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。

1.3 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件,计数资料的分

析采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。TST 和 IGRAs 的检测一致性比较采用 kappa 检验。

2 结 果

2.1 4 种方法的诊断性能比较 IGRAs 对肺结核病的诊断灵敏度为 88.3%(53/60),与 TST(66.7%, $\chi^2=12.85,P<0.01$)、抗酸染色(31.7%, $\chi^2=25.65,P<0.01$)和分枝杆菌培养(46.7%, $\chi^2=18.43,P<0.01$)3 种方法相比,差异具有统计学意义。而特异性上,IGRAs(89.9%)也高于 TST(75.3%)。因此总体来说,在 4 种方法中,IGRAs 对肺结核病的诊断性能最高。TST 和 IGRAs 对肺结核感染一致性比较:结果见表 1。TST 和 IGRAs 对诊断肺结核的检测一致性较差,IGRAs 的诊断灵敏度和特异性均显著高于 TST。差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 TST 和 IGRAs 对肺结核感染一致性比较四格表(n)

组别	IGRAs+	IGRAs-
TST+	40	22
TST-	12	75

2.2 IGRAs 对活动性肺结核的诊断性能 见表 2。IGRAs 对活动性肺结核的诊断灵敏度(93.8%)显著高于非活动性肺结核(82.1%),差异有统计学意义($\chi^2=5.74,P<0.05$)。

表 2 IGRAs 对活动性肺结核的诊断性能表

肺结核分组	EAST-6 刺激(SFCs)		CFP-10 刺激(SFCs)		EAST-6+CFP-10 共刺激(SFCs)		灵敏度(%)
	平均数	Q25~Q75*	平均数	Q25~Q75	平均数	Q25~Q75	
活动性肺结核(n=32)	368/106	(115~623)/106	479/106	(130~692)/106	923/106	(168~750)/106	30(93.8)
非活动性肺结核(n=28)	145/106	(62~214)/106	178/106	(75~240)/106	365/106	(84~310)/106	23(82.1)

注:* Q25 为 25 分位数;Q75 为 75 分位数。

3 讨 论

目前我国结核病年发患者数约为 130 万,占全球发病的 14.3%,位居全球第 2 位,仅次于印度。尤其是近年来,结核病疫情日益恶化,究其原因,一方面是艾滋病、肿瘤等疾病的逐渐增多、器官移植的广泛开展、高强度免疫抑制剂和大剂量抗肿瘤药物的使用,导致患者免疫功能逐渐低下,结核易感性增加;另一方面是耐药性结核病患者尤其是耐多药(MDR)结核病患者数量的急剧上升。因此,结核病的诊断和治疗再次成为全球性的医疗难题。

传统的结核菌检测方法有 TST、抗酸染色涂片检查和分枝杆菌培养等。TST 是近一个世纪来应用最广泛的传统方法,但 TST 存在着皮内注射风险、观察结果需时较长以及给患者带来不便等缺点,同时因使用纯化蛋白衍生物(PPD)在鉴别诊断结核分枝杆菌感染与非结核分枝杆菌感染及卡介苗(BCG)接种方面还存在特异性差的问题。抗酸染色涂片和分枝杆菌培养是结核病诊断的病原学标准,但存在着取样困难、阳性率低、操作繁琐、无法区分非结核分枝杆菌(如常见的牛分枝杆菌等)感染等问题。随着分子生物学技术的快速发展,包括 PCR、基因芯片、探针杂交、DNA 测序等在内的新兴分子学手段也已直接用于结核病的检测,但存在着设备昂贵、操作复杂、取样困难等问题,使其临床推广应用具有一定的局限性。因此,临床迫切需要一种新的诊断性能高、简便快速的实验室检测方法。

随着免疫学和分子生物学的发展,IGRAs 作为一种具有

高潜力的新诊断方法应运而生。IGRAs 是利用结核分枝杆菌的特异性抗原在体外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 IFN- γ ,然后用酶联免疫吸附法或酶联免疫斑点法检测 IFN- γ 浓度或计数分泌 IFN- γ 细胞个数的方法。IGRAs 的代表性试验有两种:一种是澳大利亚 Cellestis 公司的 QuantiFERON-TB Gold(QFT-G)和新一代 QuantiFERON-TB Gold In-Tube(QFT-IT)方法,利用酶联免疫吸附法检测外周血淋巴细胞经结核分枝杆菌特异性抗原刺激后产生的 IFN- γ ,已分别于 2005 和 2007 年被美国 FDA 批准为结核筛查试验;另一种是英国 Oxford Immunotech 公司的 T-SPOT.TB 检测法,主要测量经结核分枝杆菌特异性抗原体外刺激后能产生 IFN- γ 的外周血致敏 T 淋巴细胞的数量,在 2008 年被美国 FDA 批准作为 IGRAs 的新方法^[1]。T-SPOT 使用结核分枝杆菌特有的片段即缺失区域(RD)基因编码的早期分泌靶抗原 6 和培养过滤蛋白 10 作为抗原特异性抗原,而 QFT-G 另外还使用 TB7.7 抗原^[2-3]。由于这些抗原是非结核分枝杆菌感染和卡介苗接种患者不会产生的,所以 IGRAs 对于检测个体对结核分枝杆菌感染的免疫应答,尤其是非结核分枝杆菌感染和卡介苗接种患者的特异性高于传统的 TST 方法。这两种技术在发达国家均得到很好的利用,特别是在涂片阴性的结核患者及处于潜伏期的结核接触人群的筛选。有相关系统评价指出,对于处于潜伏期的结核患者,QFT-IT 技术检出的灵敏度可以达到 70%以上,运用 T-SPOT.TB 检出的灵敏度更可高达 90%,并且不受疫苗接种的影响。而从特异性角度来说,前者的特异

性在未接种疫苗人群特异性高达 99%，在接种了疫苗人群中其特异性依旧高达 96%；而后者实验特异性也可达到 93%。这些数据都提示，这个新的技术有助于提高结核的检出率。

在本研究中，IGRAs 对肺结核病的诊断灵敏度为 88.3% (53/60)，显著高于 TST (66.7%)、抗酸染色 (31.7%) 和分枝杆菌培养 (46.7%)，而其特异性也显著高于 TST (89.9% : 75.3%)，表明 IGRAs 对肺结核病的诊断性能显著高于 TST。而抗酸染色和分枝杆菌培养从理论上来说，是结核病感染的病原学标准，特异性应为 100%，但由于非结核分枝杆菌感染的影响，其特异性也会降低。本实验由于实验对象的依从性问题，没有对非结核肺疾病组和健康对照组进行该两项试验。从表 2 中可以看出，IGRAs 对活动性肺结核的诊断灵敏度高达 93.8%，显著高于非活动性肺结核 (82.1%)。整个研究结果与国内外学者的结果相仿^[4-8]。Mori 等^[9]研究表明，在 216 例有卡介苗接种史而无结核菌暴露史的健康者中，其全血经 ES-AT6 和 CFP10 共刺激后，仅有 4 例显示阳性结果，特异性为 98.1%，而在 118 例经分枝杆菌培养病原学证实的结核病患者中，有 105 例出现了阳性结果，灵敏度达到 89%，其灵敏度与本研究相仿，但特异性高于本研究结果。因此，从国内外报道及本研究结果都可以看出，IGRAs 对结核感染具有较高的诊断和鉴别诊断价值，特别是结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌属感染的鉴别诊断中。Lein 等^[10]报道，27 例肺结核患者中有 16 例 (59%) 可诱导产生高浓度的 IFN- γ ，而在 8 例鸟分枝杆菌复合群性肺感染患者中未发现阳性结果。本研究中，由于病例收集的原因，仅对肺结核患者进行了分析，对肺外结核感染未涉及，而 Chapman 等^[11]报道证实 IGRAs 在活动性肺结核、肺外结核和潜伏性结核感染以及免疫抑制的结核患者中均可检出。此外，当结核分枝杆菌被清除后，致敏 T 淋巴细胞就会消失，此时检测致敏 T 淋巴细胞也可反映出机体是否清除了结核分枝杆菌，从而进行临床疗效评估^[12-13]。

与 TST 相比，IGRAs 的灵敏度高、特异性高，检测时间较短 (24~48 h)，不需受试者回访，而且不会激发记忆性免疫反应等优点，因此已越来越多地被临床用于替代传统的 TST。但同样需要看到，IGRAs 也存在着固有的一些缺点：(1) 需要的全血量大，对于婴幼儿患者很难采集到充足的标本量；(2) 标本处理需要及时，一般要求在 2 h 内就需要对标本进行前处理；(3) 在孵育过程中，可能会触发一些免疫功能，如 T 细胞增殖、细胞因子的产生等，有可能对检测结果产生影响；(4) IGRAs 对于实验室条件、操作人员、试验流程等要求较高，且试剂成本高昂，对于临床的广泛推广应用具有一定的局限性。另外，欧洲 CDC 指南还特别提示，在大多数临床情况下，IGRAs 阴性并不能完全排除活动性结核感染。

综上所述，IGRAs 具有灵敏度高、特异性高、检测时间短、标本易于采集等特点，是一种逐渐替代传统 TST 方法的结核诊断的新的辅助试验，可用于结核分枝杆菌感染的诊断、鉴别诊断和疗效观察，但由于其临床意义的局限性，如何正确使用和判断结果必须成为临床关注的问题。

参考文献

[1] 肖荣,陈瑜. 干扰素释放试验诊断 HIV 携带者并发结核的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(8): 612-614.

[2] Ozekinci T, Ozbek E, Celik Y. Comparison of tuberculin skin test and a specific T-cell-based test, T-Spot[J]. TB, for the diagnosis of latent tuberculosis infection. J Int Med Res, 2007, 35(5): 696-703.

[3] Bruzzese E, Bocchino M, Assante LR, et al. Gamma interferon release assays for diagnosis of tuberculosis infection in immune-compromised children in a country in which the prevalence of tuberculosis is low[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2355-2357.

[4] Kim SH, Lee So, Park IA, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for latent tuberculosis infection in kidney transplant candidates ketore transplantation [J]. Transpl Infect Dis, 2010, 12(2): 113-119.

[5] 吴多池, 黄守凤, 郭爱珍. γ -干扰素释放试验诊断结核分枝杆菌感染的临床意义[J]. 广东医学, 2011, 32(10): 1317-1319.

[6] 蒋英, 张胜男, 黄小玲, 等. γ 干扰素释放试验用于结核病诊断的临床应用价值[J]. 中国药业, 2012, 21(13): 88-90.

[7] Ariga H, Kawabe Y, Nagai H, et al. Diagnosis of active tuberculous serositis by antigen-specific interferon-gamma response of cavity fluid cells[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(12): 1559-1567.

[8] Krenke R, Safianowska A, Paplinska M, et al. Pleural fluid adenosine deaminase and interferon gamma as diagnostic tools in tuberculosis pleurisy[J]. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(Suppl 6): 349-360.

[9] Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Specific detection of tuberculosis infection; an interferon-gamma-based assay using new antigens[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(1): 59-64.

[10] Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, et al. 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[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(4): 606-609.

[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): 2285-2293.

[12] Kobashi Y, Mouri K, Yagi S, et al. Transitional changes in T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens during treatment[J]. J Infect, 2009, 58(3): 197-204.

[13] Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB; a metaanalysis[J]. Chest, 2010, 137(4): 952-968.