

全血 γ 干扰素释放试验在活动性肺结核诊断中的应用

周祖模 金嘉琳 王森 黄河清 石勇明 陈林 张文宏 翁心华

【摘要】 目的 评价全血 γ 干扰素释放试验在活动性肺结核诊断中的应用价值。方法 应用一种全血 γ 干扰素释放检测试剂盒 QuantiFERON-TB gold in tube (QFT-GIT) 对 48 例活动性肺结核患者(活动性结核组)进行检测,同时选取 55 例健康者作为对照(对照组),均通过调查问卷排除结核病接触史。结果 本研究活动性结核组患者和对照组 QFT-GIT 阳性率分别为 93.8% 和 11.1%, QFT-GIT 诊断活动性肺结核的总体敏感性和特异性分别为 93.8% 和 88.9%, 阳性和阴性预测值分别为 88.2% 和 94.1%。活动性结核组抗原特异性 T 细胞应答率显著高于对照组 ($P < 0.0001$)。随着抗结核化疗疗程的延长,活动性结核组中的抗原特异性 T 细胞释放的 γ 干扰素水平逐步下降 ($P < 0.05$)。结论 QFT-GIT 用于诊断活动性肺结核具有较高的敏感性和特异性,其结果不受卡介苗接种的影响,具有较高的临床应用价值。

【关键词】 结核,肺;酶联免疫吸附试验;全血;诊断

Clinical application of whole blood interferon- γ release assay on diagnosis of active pulmonary tuberculosis ZHOU Zu-mo, JIN Jia-lin, WANG Sen, HUANG He-qing, SHI Yong-ming, CHEN Lin, ZHANG Wen-hong, WENG Xin-hua. People's Hospital of Zhuji, Zhejiang Province, Zhuji 311800, China
Corresponding author: JIN Jia-lin, Email: jinjialin@fudan.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To evaluate the application of whole blood interferon- γ release assay QuantiFERON-TB gold in tube (QFT-GIT) on the diagnosis of active pulmonary tuberculosis in China. **Methods** With the commercial whole blood interferon- γ QFT-GIT kit, interferon- γ released by specific T cells stimulated under early secreted antigenic target 6 kD protein (ESAT-6), culture filtrate protein 10 (CFP-10) and TB7.7 were measured among 48 cases with active pulmonary tuberculosis and 55 BCG (bacillus calmette-guérin)-vaccinated healthy controls, who had no tuberculosis contact history by questionnaire. **Results** The QFT-GIT was positive in 93.8% patients with active pulmonary tuberculosis and 11.1% healthy controls, respectively. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of QFT-GIT were 93.8%, 88.9%, 88.2% and 94.1%, respectively. The antigen-specific IFN- γ release was significantly higher in patients with active pulmonary tuberculosis in comparison with that in the controls ($P < 0.0001$). Furthermore, after anti-tuberculosis treatment, the antigen-specific IFN- γ decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** QFT-GIT is a sensitive and specific assay for detecting tuberculosis, which could discriminate the active tuberculosis patients from BCG vaccinated healthy controls and could be a convenient and useful diagnostic tool for the diagnosis of tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Whole blood; Diagnosis

结核病是一种长期危害全球的慢性传染病,病死率居传染性疾病第二位。我国是世界上 22 个结核病高发的国家之一,现有结核患者约 450 万,其中开放性肺结核患者数高达 200 万,每年约有 13 万人

因结核病死亡^[1]。目前结核病确诊的主要依据依然是细菌学检查(包括培养和涂片)。但结核杆分枝菌的培养时间较长(6~8周),而且 10%~20% 的病例结核杆分枝菌培养失败^[2],不利于临床结核病的诊断和治疗;痰涂片法虽然简便、快速,但是敏感性很低,平均检出率仅为 25%~35%^[2]。因我国卡介苗(bacillus calmette-guérin, BCG)的高接种率而使结核菌素皮试应用受到限制。因此,为了能够对结核疑似或高危人群进行早期诊断并进行及时有效的治疗,近年来一种基于细胞免疫反应的 γ -干扰素释

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.004

基金项目:浙江省自然科学基金(No. 2011C23032),上海市卫生局科研课题(No. 2010088)

作者单位:311800 浙江省诸暨市人民医院感染科(周祖模、黄河清、石勇明、陈林);复旦大学附属华山医院感染科(王森、张文宏、金嘉琳、翁心华)

通讯作者:金嘉琳,Email:jinjialin@fudan.edu.cn

放试验(interferon- γ release assay, IGRAs)得以飞速发展。

IGRAs 的诊断原理为受到结核分枝杆菌抗原刺激而致敏的 T 细胞,再次遇到同类抗原时能够产生细胞免疫反应,释放以干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)为主的因子,因此对全血或分离的外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)在结核分枝杆菌特异性抗原刺激后产生的 IFN- γ 释放量进行检测,即可判断是否存在结核分枝杆菌感染。国内 T-SPOT[®] TB 检查已经开始广泛应用,但 T-SPOT 存在对操作要求较高,价格昂贵等不足,在部分地区无法广泛推广。本研究首次评价一种基于全血的 IGRAs—QuantiFERON-TB gold in tube (QFT-GIT) 在活动性结核病临床诊断中的应用价值。

资料和方法

一、研究对象

收集诸暨市人民医院 2010 年 6~9 月门诊和住院的活动性肺结核患者共 48 例,病例入选标准为实验室确诊(痰抗酸杆菌涂片或结核分枝杆菌培养阳性)的初治肺结核患者,抗结核化疗疗程 < 1 个月。其中男性 33 例、女性 15 例,年龄 16~86 岁,中位年龄 40 岁。

健康对照者共 55 例,为复旦大学的学生志愿者,入选之前均通过调查问卷排除其结核病接触史。其中男性 32 例、女性 23 例,年龄 21~30 岁,中位年龄 24 岁。所有入选者均无免疫系统性疾病,且近 3 个月内未使用免疫抑制剂。

二、方法

本实验中全血 IFN- γ 释放试验应用 QFT-GIT 试剂盒,试剂盒中提供 3 种采血管,分别为阳性对照管(mitogen control),管内含阳性对照-植物凝集血凝素(PHA);阴性对照管(nil control),内含不加抗原的生理盐水;结核抗原管(TB antigen),内含结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6(the 6 kD early secreted antigenic target)、CFP-10(culture filtrate protein 10)和 TB7.7 的多肽混合物。每位检测者均需采集 3 管外周静脉血,每管约 1 ml,经充分混匀待管内的抗原充分溶解。混匀后的采血管需尽快置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内,最长 16 h。经过 16~24 h 培养后,采血管经离心后收集上层血清。血清可在 2~4 $^{\circ}$ C 中保存 14 d,更长时间需在 -20 $^{\circ}$ C 条件下。收集的血清保存通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中 IFN- γ 的释放量。

ELISA 操作步骤完全按照试剂盒提供的说明书进行。QFT 的结果判定标准为:①阳性:结核抗原

管-阴性对照管 ≥ 0.35 IU/ml;②阴性:阳性对照管 > 0.5 IU/ml,结核抗原管-阴性对照管 < 0.35 IU/ml;③不定(indeterminate):阳性对照管和结核抗原管-阴性对照管 < 0.35 IU/ml 或阴性对照管 ≥ 8.0 IU/ml。结果的计算和判定也可应用相应软件(A-QFT, 2.61 版本)进行。

三、统计学处理

采用 STATA(Ver. 10.0) 统计分析软件,阳性检出率的比较采用卡方检验,不同分组 IFN- γ 释放量的比较采用非参数 Mann-Whitney 检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、QFT-GIT 在结核患者和健康对照的检测结果
入组的 48 例活动性结核患者中, QFT-GIT 检测结果阳性者 45 例,阴性者 3 例(表 1)。QFT-GIT 检测活动性结核的总体敏感性为(93.8%, 45/48)。48 例患者中,除 1 例痰涂片为阴性外,其余 47 例均为痰涂片阳性。根据痰涂片的结果,将 47 例患者分为两组,一组痰涂片为 1+~2+(30 例);一组痰涂片为 3+~4+(17 例)。两组患者 QFT-GIT 检测的敏感性分别为 90.0% 和 100.0%。痰涂片结果反映肺结核的开放性和患者的带菌量,表明 QFT-GIT 的检测效果不受这些因素的影响。QFT-GIT 阴性的 3 例患者中,1 例需应用大剂量激素治疗(每日剂量 > 25 mg),另 2 例患者年龄均 > 65 岁,提示激素、免疫抑制剂和年龄等引起机体免疫力下降的因素能够影响 QFT-GIT 诊断的敏感性。

本研究证实 QFT-GIT 具有较高的特异性,且不受卡介苗接种的影响。所招募的 55 例健康对照者中有 48 例 QFT-GIT 检测结果判定为阴性,6 例阳性,1 例结果未定。此例结果未定是由于空白对照管中 IFN- γ 含量过高,考虑其感染了其他可引起 IFN- γ 升高的病原体所致。除 1 例未定结果外, QFT-GIT 在健康对照者中的特异性为 88.9%(48/54)。根据对照组 BCG 接种的卡痂结果,BCG 接种者 42 例,未接种者 13 例。因此, QFT-GIT 检测在 BCG 接种者中的特异性为 88.1%(37/42),而在 BCG 未接种者中为 84.6%(11/13),无显著性差异,提示 QFT-GIT 的特异性不受 BCG 接种的影响,适用于 BCG 普遍接种的国家。对照组除 6 例 QFT-GIT 阳性者,均无活动性结核的临床表现,胸部 X 线检查无明显异常,除 1 例有亲戚患结核外,均无结核病密切接触史,考虑此 6 例均为潜伏性结核分枝杆菌感染。

表1 两组 QFT-GIT 试验的检测结果

	QFT-GIT 结果(例)				敏感性(%)	特异性(%)
	阳性	阴性	不定	合计		
结核患者	45	3	0	48	93.8	-
痰涂片(-)	1	0	0	1	100.0	-
痰涂片(1+~2+)	27	3	0	30	90.0	-
痰涂片(3+~4+)	17	0	0	17	100.0	-
健康对照	6	48	1	55	-	88.9
BCG 接种	4	37	1	42	-	90.2
BCG 未接种	2	11	0	13	-	84.6
合计	51	51	1	103	93.8	88.9

注:“-”:无数据,在结核患者中仅计算敏感性,在健康对照中仅计算特异性

二、结核组和健康对照组中结核抗原特异性 T 细胞应答强度

根据 QFT-GIT 检测结果比较活动性结核组和健康对照组,针对结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7 的 T 细胞应答强度,即 QFT-GIT 检测中结核抗原管减去空白对照管的 IFN- γ 释放量。结核组中 IFN- γ 释放量的平均值为 5.20 IU/ml (四分位数区间:0.96 ~ 10),而对照组的平均值为 0.71 IU/ml (四分位数区间: -0.02 ~ 0.03),两组差异具有统计学意义($P < 0.0001$) (图 1)。根据两组 IFN- γ 释放量所作的相关操作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC) 分析表明其曲线下面积(area under curve, AUC) 为 0.9265 (图 2)。根据 ROC 曲线所得到的最佳临界值为 0.195 IU/ml,这一临界值的敏感性为 95.8% (95% CI: 85.8 ~ 99.5),特异性为 89.1% (95% CI: 77.8 ~ 95.9)。

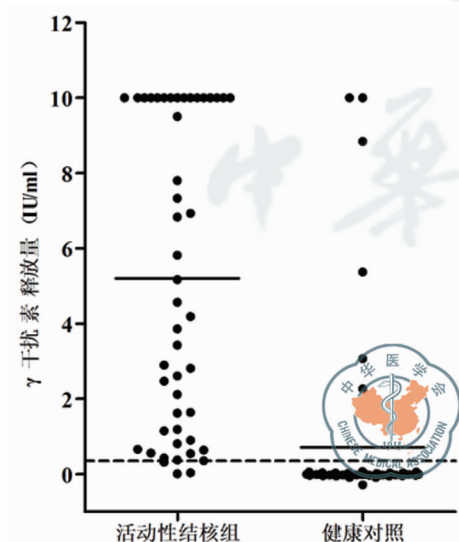


图1 活动性结核组和健康对照组中对抗原 ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7 的 T 细胞反应水平

注: γ 干扰素释放量 > 10 IU/ml 的均计为 10 IU/ml, γ 干扰素释放量 1 IU/ml = 500 pg/ml

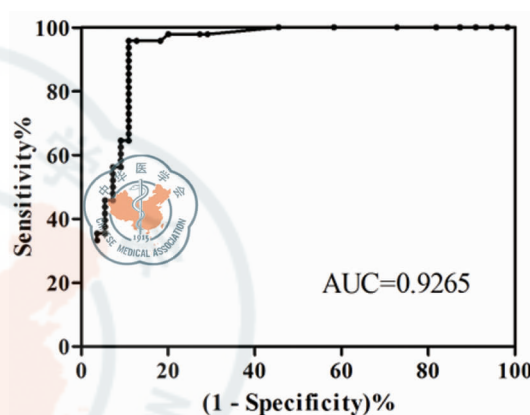


图2 γ 干扰素对抗原 ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7 的 ROC 曲线

三、结核组中不同抗结核化疗疗程与结核抗原特异性 T 细胞应答强度及 QFT-GIT 检测敏感性的关系

本研究分析了活动性结核患者不同抗结核化疗疗程与 T 细胞应答强度之间的关系。活动性结核组患者抗结核化疗疗程为 1 周之内者 7 例, 2 周者 10 例, 3 周者 13 例, 4 周者 9 例, 4 周以上者 7 例。比较不同治疗时间患者对特异性抗原的 IFN- γ 释放量, 结果显示随着抗结核治疗时间的延长, 其 T 细胞应答强度显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$) (图 3)。其中 T 细胞应答强度的降低最早出现在第 3 周, 在 4 周以后降至最低。但比较不同化疗时间 QFT-GIT 诊断的敏感性, 差异均无统计学意义。

讨 论

近年来, IGRAs 在结核病的诊断中得到了广泛的应用和认可。IGRAs 所使用抗原均为结核分枝杆菌特异性的抗原, 其编码基因位于结核分枝杆菌基因组 RD 区(region of difference), RD 区在 BCG 和绝大多数非结核分枝杆菌的基因组中缺失, 可以避免与 BCG 接种的交叉抗原反应。因此与目前广泛使用的结核菌素试验比较, 具有更高的敏感性和特异性。

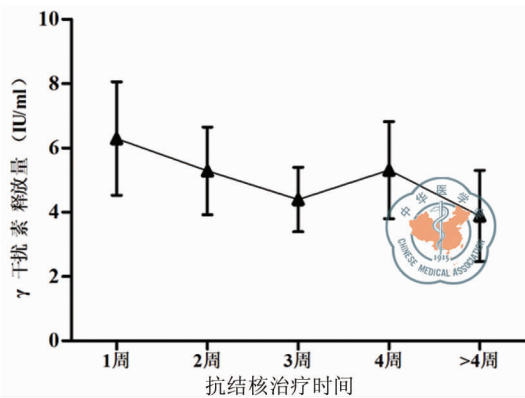


图3 活动性结核患者中不同治疗时间 γ 干扰素释放量

目前应用的 IGRAs 主要有两种^[3],一种称为 T-SPOT. TB 试验 (Oxford Immunotec, Oxford, UK), 采用高灵敏度的酶联免疫斑点法 (enzyme linked immunospot assay, ELISPOT) 检测外周血单核细胞 (PBMC) 中受结核抗原刺激后能够释放 IFN- γ 的 T 细胞数量。其采用的抗原为 RD1 区的结核分枝杆菌快速生长期分泌蛋白 ESAT-6 和 CFP-10。T-SPOT 试验在我国已进行了相关的临床研究,证实具有较高的敏感性和特异性,并且适于在 HIV 等高危人群中进行潜伏性结核感染的筛查^[4-5]。

另一种基于全血的 IGRAs 称为 QuantiFERON-TB (QFT) 试验 (Cellestis, Victoria, Australia), 是应用 ELISA 方法对全血中的致敏 T 细胞再次受到特异性抗原刺激后所释放的 IFN- γ 进行检测。QFT 试验已于 2004 年 12 月获美国 FDA 批准应用于临床,并在美国疾病控制预防中心 (CDC) 的最新指南中被推荐作为一种替代结核菌素皮肤试验 (tuberculin skin test, TST) 的检测方法^[6]。与 T-SPOT 方法相比, QFT 试验的优点为:①直接抽取患者的全血进行检测,而无需从全血中分离 PBMC,对技术和实验条件要求都较低;②最新一代的 QFT 试验将抗原直接包被在采血管壁上,将采血与抗原刺激结合起来,因此可以简化操作步骤,便于在结核高危地区进行大规模的筛查和远距离运输;③QFT 试验中, IFN- γ 含量应用 ELISA 检测,可以直接定量,便于对结果进行判定,而 T-SPOT 的最后斑点需专用机器读取。④QFT 的抗原除 RD1 区的 ESAT-6 和 CFP-10 外,还增加了 RD11 区抗原 TB7.7 (Rv2654),以增加其诊断的敏感性。本研究为国内首次对其诊断的敏感性和特异性进行评估。

Menzies 等^[7]荟萃分析结果显示, QFT 诊断结核分枝杆菌感染的敏感性为 97.7%; 本研究结果表明, QFT-GIT 诊断活动性肺结核的敏感性为 93.8%, 特

异性为 88.9%, 与其基本一致。从而证实了 QFT-GIT 在诊断结核病方面的检测效果。QFT-GIT 的高度特异性是由其所采用的 RD 区抗原所决定的, 由于与 BCG 之间不存在交叉抗原反应, 因此, 能够克服 TST 的局限性, 特别适用于 BCG 高接种的国家。本研究 55 例健康对照中, 有 6 例 QFT-GIT 检测阳性, 其均无结核感染的临床症状和明显的结核接触史, 并经过 X 线胸片检查排除了活动性结核。由于我国是结核病高流行国家, 结核分枝杆菌感染率约为 30%, 因此, 考虑此 6 例 QFT-GIT 阳性者均为潜伏性结核分枝杆菌感染, 这种既往感染往往通过简单的调查问卷不能完全排除。

QFT 的应用与 T-SPOT 相比, 也存在一定局限性: 一方面 ELISA 法与 ELISPOT 法比较, 敏感性不够强; 另一方面, QFT 采用定量的患者全血, 其中有免疫活性的 T 细胞数量存在个体差异, 尤其是在免疫抑制的患者中。研究表明, HIV 感染者中, 由于有免疫活性的 T 细胞数量过少, QFT 检测会出现较多未定的结果, 而 T-SPOT 则分离定量的外周血淋巴细胞, 一定程度上可避免这种情况的发生。相关研究表明, QFT 出现不定的结果, 主要与年龄过高和免疫力低下这两个因素有关^[8]。对 QFT 的局限性, 可通过增加抗原及增加其他诊断标志物等进行改进。目前新一代的 QFT-GIT 试剂, 除 ESAT-6 和 CFP-10 以外, 还增加了 TB7.7 作为抗原以提高诊断的敏感性。目前有研究证实, 除 IFN- γ 外, 同时检测其他细胞因子如 IP-10 和 IL-2 等, 可增加敏感性和避免不定结果的发生^[9-10]。

根据活动性结核患者对结核分枝杆菌特异性抗原的 T 细胞应答强度, 可见随着抗结核治疗时间的延长, 其应答强度呈下降趋势, 从而提示经规范抗结核化疗后, 随着体内菌量的下降, 特异性 T 细胞应答开始降低, 从而导致 IFN- γ 释放量降低。由于本研究中的活动性结核患者治疗时间均在 1 个月之内, 因此虽然有应答强度的下降, 但并未影响诊断的敏感性, 相关研究表明, 有效抗结核治疗 3 个月后会显著影响 QFT 诊断的敏感性^[11]。

总之, 本研究表明全血 IFN- γ 释放试验 QFT-GIT 在我国用于诊断活动性肺结核具有较高的敏感性和特异性, 适用于未接受或接受短程 (< 1 个月) 抗结核化疗的结核病的诊断。QFT-GIT 具有较高的特异性, 结果不受 BCG 接种的影响, 适用于活动性结核的诊断以及对结核感染高危人群进行筛查; 另因其操作简便、出结果迅速及对操作技术要求较低等特点, 在我国具有较高的临床应用价值。

参 考 文 献

- 1 刘剑君, 么鸿雁. 我国结核病的流行现状和防治对策. 预防医学论坛, 2006, 12(5): 638-340.
- 2 Furin JJ, Johnson JL. Recent advances in the diagnosis and management of tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med*, 2005, 11(3): 189-194.
- 3 Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy. *Chest*, 2007, 131(6): 1898-1906.
- 4 吴妹英, 王霞芳, 肖玉梅, 等. 酶联免疫斑点法在快速诊断活动性肺结核中的应用. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(2): 1-4.
- 5 张舒, 邵凌云, 孟成艳, 等. 应用T细胞酶联免疫斑点法诊断人类免疫缺陷病毒感染合并结核潜伏感染的实验研究. 微生物与感染, 2007, 2(3): 132-137.
- 6 Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep*, 2005, 54(RR-15): 49-55.
- 7 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(5): 340-354.
- 8 Kobashi Y, Sugiu T, Mourir K, et al. Indeterminate results of QuantiFERON TB-2G test performed in routine clinical practice. *Eur Respir J*, 2009, 33(4): 812-815.
- 9 Ruhwald M, Petersen J, Kofoed K, et al. Improving T-cell assays for the diagnosis of latent TB infection: potential of a diagnostic test based on IP-10. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2858.
- 10 Goletti D, Raja A, Syed Ahamed Kabeer B, et al. Is IP-10 an accurate marker for detecting *M. tuberculosis*-specific response in HIV-infected persons? *PLoS One*, 2010, 5(9): e12577.
- 11 Sauzullo I, Mengoni F, Lichtner M, et al. In vivo and in vitro effects of antituberculosis treatment on mycobacterial interferon-gamma T cell response. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5187.

(收稿日期: 2012-03-27)

(本文编辑: 孙荣华)

周祖模, 金嘉琳, 王森, 等. 全血 γ 干扰素释放试验在活动性肺结核诊断中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(6): 527-531.



中 华 医 学 会