

## 结核感染 T 淋巴细胞 IFN- $\gamma$ 释放实验临床检测分析\*

张培莉<sup>a</sup>, 刘义庆<sup>a</sup>, 邵 婧<sup>a</sup>, 陈兰兰<sup>a</sup>, 牛登冉<sup>a</sup>, 段文冰<sup>a</sup>, 张 栋<sup>b</sup>

(山东大学附属省立医院 a. 临床医学检验部; b. 泌尿外科, 济南 250021)

**摘要:**目的 探讨结核感染 T 淋巴细胞  $\gamma$  干扰素释放试验 (IGRAs) 在临床检测结核病中的应用价值。方法 利用 IGRAs 方法检测 2013~2016 年 11 968 例门诊及住院结核筛查患者。按科室分布分析, 同时对检测阳性病例按性别、年龄进行分析比较, 并对不确定结果进行分析。另外对不同方法检测结核杆菌感染情况进行比较。结果 11 968 例筛查者中, 2 048 例阳性, 阳性率为 17.11%, 不确定结果 107 例, 占总检测数的 0.89%。2013~2016 年检测阳性率分别为 19.65%, 21.35%, 15.82% 和 13.56%。肺内及肺外结核检测筛查中, 呼吸科、消化科、肿瘤科、神经科和妇科阳性率分别为 22.07%, 20.27%, 23.38%, 12.84% 和 11.86%。阳性筛查者中, 男性占 62.11%, 女性占 37.89%, 男性明显高于女性。按年龄分组,  $\leq 15$ , 16~25, 26~45, 46~65 和  $\geq 66$  岁, 各年龄段阳性率分别为 1.96%, 18.51%, 16.54%, 21.25% 和 25.73%。分析不确定结果数据, 风湿免疫科、血液科比例最高, 分别占 1.99% 和 2.35%。与其它实验室检测方法对比, IGRAs 方法具有明显优势。结论 结核好发于全身各个器官, 结核菌感染存在性别、年龄差异。IGRAs 是灵敏和特异的快速检测结核分枝杆菌感染的方法, 虽不能作为确诊指标, 但为进一步确诊疾病, 在结核疑似患者筛查中具有较大临床应用价值。

**关键词:**  $\gamma$  干扰素释放试验; 结核; T 淋巴细胞; 实验室技术和方法

**中图分类号:** R378.911; R446.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)01-022-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.01.007

### Interferon Gamma Release Assays from T Lymphocytes in Patients with Tuberculosis Infection

ZHANG Pei-li<sup>a</sup>, LIU Yi-qing<sup>a</sup>, SHAO Jing<sup>a</sup>, CHEN Lan-lan<sup>a</sup>, NIU Deng-ran<sup>a</sup>, DUAN Wen-bing<sup>b</sup>,

ZHANG Dong<sup>2</sup> (a. Department of Clinical Laboratory; b. Department of Urology,

Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

**Abstract: Objective** To explore the application value of interferon gamma release assay (IGRAs) in the clinical detection of tuberculosis infected T lymphocytes. **Methods** Used IGRAs method to detect the 11 968 outpatients and hospitalized patients from 2013 to 2016 with tuberculosis screening. According to the distribution department analysis, also of positive case detection according to age and gender were analysis and comparison and analysis on the uncertainty of results, different methods were compared. **Results** Among the 11 968 cases, 2 048 cases were positive, the positive rate was 17.11%, and the uncertain result was 107 cases, which accounted for 0.89% of the total number. The positive rates from 2013 to 2016 were 19.65%, 21.35%, 15.82% and 13.56%, respectively. In the detection and screening of pulmonary and pulmonary tuberculosis, the positive rates of the department of respiration, the digestive department, the oncology department, the department of neurology and the department of gynecology were 22.07%, 20.27%, 23.38%, 12.84% and 11.86%, respectively. In the positive screening, men accounted for 62.11%, women accounted for 37.89%, men were significantly higher than women. By age group, was less than or equal to 15, 16~25, 26~45, 46~65, was more than or equal to 66 years old, positive rate were 1.96%, 18.51%, 16.54%, 21.25% and 25.73%, respectively. Analysis of uncertain outcome data, department of respiration, rheumatism, department of hematology, accounted for 1.99% and 2.35%, respectively. Compared with other laboratory methods, the IGRAs method had obvious advantages. **Conclusion** Tuberculosis occurs in various body organs, there were differences in gender and age of Mycobacterium tuberculosis infection. IGRAs is a sensitive and specific method for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection, although it can not be used as a diagnostic indicator, but in patients with suspected tuberculosis IGRAs has a larger clinical application value for the further diagnosis of disease.

**Keywords:** interferon gamma release assays (IGRAs); Tuberculosis; T lymphocytes; laboratory techniques and methods

结核病是严重危害公众健康的全球性公共问题。我国是全球第二大结核病高负担国家。潜伏结核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 是

结核感染的一种, 发病率高, 全世界近 1/3 的人口曾感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB), 大多数分布在全球 22 个结核病高负担

\* 基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2016HM52); 山东省科学技术发展计划资助项目(2014GGH218041); 山东省临床重点专科项目(鲁卫医字[2013]26号)。

作者简介: 张培莉(1987-), 女, 本科, 技师, 主要从事免疫学检验工作, Tel: 15168863575, E-mail: zp1117@126.com。

通讯作者: 刘义庆, E-mail: yqliu1979@163.com。

国家<sup>[1]</sup>。如果不治疗,有 5%~10% 的 LTBI 者将会发展成结核病。因此,对结核分枝杆菌的快速检测用于早期鉴别和治疗将有助于控制结核病的发病率。传统的临床诊断结核的实验室方法有限,极易误诊漏诊。因此,发展快速敏感的检测技术十分必要。

20 世纪 90 年代,科学家们通过比较基因组学发现了结核分枝杆菌具有而卡介苗、其他分枝杆菌没有的基因区域,且位于此区域的两个蛋白早期分泌抗原-6 (ESAT-6) 和培养基滤过蛋白-10 (CFP-10) 具有较强的 Th 表位。在此基础之上,国外学者结合 T 细胞免疫检测技术的进展建立了一种新型的结核特异性 T 细胞。免疫体外检测方法采用 T 细胞 IFN- $\gamma$  体外释放试验 (IGRAs)<sup>[2,3]</sup>。IGRAs 的原理为:加入结核抗原 ESAT-6 和 CFP-10,经过全血中的抗原递呈细胞刺激特异性 T 细胞产生 IFN- $\gamma$ ,于 37℃ 体外培养 18~24 h 后检测培养液中 IFN- $\gamma$  含量判断全血中是否存在结核特异性 T 细胞及其活力。

由于结核特异抗原是卡介苗 (BCG) 和绝大多数环境细菌所没有的,不受先前卡介苗接种的影响,较结核菌素皮下试验 (TST) 更具特异性。笔者利用 IGRAs 方法检测临床标本,回顾性分析检测结果,同时与其他结核实验室检测方法进行比较,探讨相关检测技术在临床中的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 对本院 2013~2016 年 11 968 例门诊及住院结核筛查患者进行 IFN- $\gamma$  释放试验检测,男性 6 636 例,女性 5 332 例,年龄 1~92 岁。

1.2 仪器与试剂 流水线式全自动酶联免疫工作站 Mars E180,37℃ 恒温恒湿培养箱。试剂采用北京万泰公司结核感染 T 细胞检测试剂盒 (体外释放酶联免疫法)。

1.3 全血  $\gamma$  干扰素释放试验方法 空腹抽取肝素锂抗凝静脉血 4 ml,于 2 h 内分别分装于本底对照培养管“N”、测试管“T”、阳性对照管“P”中,1 ml/管,轻柔颠倒混匀 3~5 次,立即放入 37℃ 培养箱中,直立培养 22±2 h。培养后的培养管以 3 000~5 000 r/min 离心 10 min,取离心上清液进行 ELISA 检测,仪器在 450 nm 处测定其吸光度 A,依据试剂盒中校准品所作标准曲线,得出所检测  $\gamma$  干扰素含量 (pg/ml)。

1.4 判断标准 阳性:本底培养管 N≤400 pg/ml,测试培养管 T-本底对照培养管 N≥14 pg/ml,并且 ≥N/4 pg/ml;阴性:本底培养管 N≤400 pg/ml,阳性对照培养管 P-本底对照培养管 N≥20 pg/ml,测试培养管 T-本底对照培养管 N<14

pg/ml,或虽然测试培养管 T-本底对照培养管 N≥14 pg/ml,但 N/4< pg/ml;不确定:当 N>400 pg/ml,或阳性对照培养管 P-本底对照培养管 N<20 pg/ml。

1.5 统计学分析 检测结果均用阳性率表示。采用 SPSS21.0 软件对实验数据进行统计分析处理,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFN- $\gamma$  检测 TB 结果 见表 1。在全部 11 968 例门诊及住院结核筛查患者中,2 048 例 TB-IGRA 阳性,阳性率为 17.11%,107 例不确定结果病例,占总检测数的 0.89%。9 813 例阴性,占 81.99%。2013~2016 年检测阳性率分别为 19.65%,21.35%,15.82%,13.56%,差异有统计学意义 ( $\chi^2=72.791, P=0.000<0.05$ )。

表 1 2013~2016 年 TB 分布情况 [n(%)]

年份	n	阳性	不确定	阴性
2013	1 247	245(19.65)	11(0.88)	991(79.47)
2014	3 008	641(21.31)	29(0.96)	2 338(77.73)
2015	5 140	813(15.82)	53(1.03)	4 274(83.15)
2016	2 573	349(13.56)	14(0.54)	2 210(85.89)

2.2 科室分布情况 见表 2。笔者对 11 968 例样本 (阳性例数 2 048) 进行分科室统计。结核病主要是以肺部受累最为常见,可侵及多个脏器,分析结果可示。其中呼吸科、消化科、肿瘤科阳性率较高,分别为 22.07%,20.27%,23.38%。风湿免疫科比例也较高,分析显示阳性率为 9.97%。风湿性疾病常常自身免疫耐受受损,B 淋巴细胞异常激活和 T 淋巴细胞异常反应,长期大剂量的激素和免疫抑制剂的使用加重机体的免疫抑制状态,会使结核感染率增高。

表 2 科室分布情况

科 室	筛查例数	阳性例数	百分比 (%)
呼吸科	3 575	789	22.07
风湿免疫科	2 056	205	9.97
血液科	724	65	8.98
肾内科	983	63	6.41
儿科	335	40	11.94
神经科	366	47	12.84
消化科	439	89	20.27
肿瘤科	201	47	23.38
妇科	59	7	11.86
其他	3 230	696	21.55

2.3 性别分布情况 见表3。对 IFN- $\gamma$  检测 2 048 例阳性样本进行性别统计,结果显示在 2 048 例阳性样本中,男性占总阳性数的 62.11%,女性占总阳性数的 37.89%。男性筛查者中阳性率为 19.17%,女性筛查者中阳性率为 14.55%。阳性率男性明显高于女性,差异有统计学意义( $\chi^2 = 44.385, P=0.000 < 0.05$ )。

2.4 年龄分布情况 见表3。对 IFN- $\gamma$  检测 2

048 例阳性样本进行年龄统计,同时按年龄层次进行分类, $\leq 15$  岁为儿童,16~25 岁为青年,26~45 岁为青壮年,46~65 岁为中年, $\geq 66$  岁为老年。阳性率最高在  $\geq 66$  岁的老年人群,阳性率为 25.73%,儿童和青壮年检测阳性率均低于中老年人。结果显示阳性率随年龄的增长有逐渐上升的趋势,差异有统计学意义( $\chi^2 = 548.669, P=0.000 < 0.05$ )。

表3 TB-IGRA 阳性样本性别、年龄差异

年龄 (岁)	男性(n=6 636)			女性(n=5 332)			合计
	n	阳性	阴性	n	阳性	阴性	
0~15	1 449	37(2.55)	1 412(97.45)	895	9(1.01)	886(98.99)	46(1.96)
16~25	463	99(21.38)	364(78.62)	407	62(15.23)	345(84.77)	161(18.51)
26~45	1 307	238(18.21)	1 069(81.79)	1 305	194(14.87)	1 111(85.13)	432(16.54)
46~65	2 030	500(24.63)	1 530(75.37)	1 792	312(17.41)	1 480(82.59)	812(21.25)
66~	1 387	398(28.70)	989(71.30)	933	199(21.33)	734(78.67)	597(25.73)
合计		1 272(19.17)	5 364(80.83)		776(14.55)	4 556(85.45)	2 048(17.11)

2.5 TB-IGRA 不确定结果科室分布情况 见表4。对 107 例检测不确定结果进行分科室分析,显示血液科比例最高,为 2.35%,其次为风湿免疫科,为 1.99%。

表4 TB-IGRA 不确定结果科室分布情况

科室	筛查例数	不确定例数	百分比(%)
呼吸科	3 575	30	0.84
风湿免疫科	2 056	41	1.99
血液	724	17	2.35
肾内	983	8	0.81
消化	439	4	0.91
其他	4 191	7	0.17

2.6 TB-Ab 和 TB-DNA 阳性情况 分析 2016 年 349 例检测阳性样本,其中 129 例同时检测了结核抗体,19 例同时检测了 TB-DNA,阳性率分别为 7.75%(10/129),5.26%(1/19)。

3 讨论 自 20 世纪 80 年代以来,传染病大多得到有效的控制,但结核病仍在不断侵袭着人类的健康。近年来结核病发病率不断攀升,对人类的健康造成严重威胁。结核病的预防主要是早期发现、早期治疗。

目前临床对结核病的实验室检测方法主要有抗酸杆菌涂片、结核抗体及结核分枝杆菌 DNA 检测。这些检测方法在临床中存在敏感度低、特异性差、操作复杂、检测周期长等缺点,常规结核病实验室检测阳性率低于 60%。结核分枝杆菌培养是诊断结核病的金标准,培养周期需 2 个月时间,阳性

率取决于采集标本中细菌的数量,不利于早期诊断和治疗。影像学检查仅对活动性肺结核诊断具有参考价值,对肺外结核诊断存在困难。因此,寻找一种敏感度高、特异度高、快速、简便的方法成为人们研究的焦点。

本研究针对结核分枝杆菌 IFN- $\gamma$  释放试验进行分析,结核筛查患者中阳性率为 17.11%,低于刘斌等<sup>[4]</sup>的文献中 IGRAs 在可能病例中的阳性率为 38.89%,原因可能为文献中的筛查对象为感染科,而本研究针对的科室比较广泛,人群量大,疾病情况较复杂。从本文研究可示,结核感染主要是以肺部受累最为常见,可侵及许多其他脏器,会引起不同类型的结核病变。肿瘤病人、血液病人免疫力低下,也较易感染。黄翔等<sup>[5]</sup>的报道中提到,恶性血液病和胸腔感染积液等也能够引起 IFN- $\gamma$  增高。与健康人群相比,活动性结核的发病率,在接受激素或免疫抑制治疗的风湿性疾病患者中大大升高<sup>[6]</sup>。一项西班牙的研究发现,在接受激素或免疫拮抗剂治疗患者中,结核的发病率是健康人群的 6 倍<sup>[7]</sup>。对于处于免疫抑制状态的患者,从潜伏性结核发展到活动性肺结核的危险性要高于普通人群<sup>[8]</sup>。潜伏性结核及肺外结核易漏诊、误诊。在风湿科、血液科、肿瘤科等其他肺外科室对结核高危人群预测结核发病风险和对拟用 TNF 抑制剂患者进行结核排除检查是非常必要的,以便做到结核病被早发现,及时治疗,结核病病情能得到及时控制。

本文分析男性阳性率高于女性,与文献<sup>[9]</sup>抽样调查报告中的研究一致,考虑主要由于男性社交

场合比较广,一些不良饮食习惯,饮酒、吸烟史较长致呼吸道防御功能较差,免疫力降低等,基于结核的传播方式,比女性较易感染。比较各年龄段人群发现相对其他年龄段的人群,儿童、青少年阳性率较低,中老年阳性率较高。其原因可能是儿童免疫功能未成熟或相对较低,刺激浓度太低不易检测<sup>[10]</sup>,而中年人群社会压力大导致免疫力下降,成为易感者。老年人呼吸道防御功能差,多为并发性结核;研究表明,老年人自身器官功能的衰退、免疫功能的下降是诱发肺结核的重要原因之一<sup>[11]</sup>,同时老年结核病患者多为陈旧性肺结核,结核杆菌 T 细胞 IFN- $\gamma$  释放试验对隐性、既往、现症感染者都可检出阳性。针对儿童结核筛查,有研究提示:由于对 MTB 的免疫应答存在年龄的差异,因此在儿童 LTBI 的诊断中,IGRA 存在局限性,需联合其他检查共同诊断儿童 LTBI<sup>[12]</sup>。

本文研究分析 107 例不确定结果病例,占总检测数的 0.89%。其中风湿免疫科、血液科比例最高。是因为每个 IGRA 数据的产生都设定 IFN- $\gamma$  对植物血凝素(phytohemagglutinin, PHA)反应的阳性对照。在免疫抑制患者中,若阳性对照的结果为阴性,则 IGRA 的结果定义为无法判读。阳性对照在细胞免疫低下的患者中尤为重要。临床上多采用糖皮质激素及其他免疫抑制剂治疗,且剂量较大,疗程较长,常导致机体免疫功能不同程度的下降,易于并发结核感染。这部分人群筛查往往会出现不确定结果。迄今为止,接受免疫抑制剂治疗的患者,使用 QFT 法得到无法判读的结果占 2%~12%<sup>[13,14]</sup>。而使用 T. SPOT. TB 法得到无法判读的结果,有文献报道为 5.8%<sup>[14]</sup>。

在 349 例 IGRAs 方法检测阳性样本中,129 例同时检测结核抗体,阳性率为 7.75%;19 例检测了 TB-DNA,阳性率为 5.26%。相对较低的阳性率结果表明,IGRAs 方法明显优于结核抗体和 TB-DNA 等其他结核检测技术,在诊断病人和排除非病人两方面具有相对较高的价值。这与王铁山<sup>[15]</sup>的研究结果一致。

综上所述,IGRAs 方法在结核检测临床应用中不断扩大。在活动性肺结核、肺外结核、潜伏性结核感染及免疫抑制的结核患者均能快速检测,同时,当结核分枝杆菌被清除后,效应 T 淋巴细胞即消失,故检测效应 T 淋巴细胞可进行临床疗效评估。TB-IGRA 操作简便,2 天内即可发出检测报告,可用于对结核的早期筛查,可以给临床医生提供参考,随着检测成本的降低,该方法值得广泛推广和应用。

参考文献:

- [1] Sharma SK, Mohanan S, Sharma A. Relevance of latent TB infection in areas of high TB prevalence[J]. Chest, 2012, 142(3): 761-773.
- [2] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis [J]. Lancet, 2000, 356(9235): 1099-1104.
- [3] Zhang S, Shao L, Mo L, et al. Evaluation of gamma interferon release assays using *Mycobacterium tuberculosis* antigens for diagnosis of latent and active tuberculosis in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated populations [J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(12): 1985-1990.
- [4] 刘斌,殷水泽,马世武,等.全血  $\gamma$  干扰素释放试验在拟诊结核患者中的应用价值[J].西南国防医药, 2014, 24(7): 721-723.  
Liu B, Yin SZ, Ma SW, et al. Application value of interferon gamma release assays in suspected cases with tuberculosis [J]. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China, 2014, 24(7): 721-723.
- [5] 黄翔,陈晋.结核性胸腔积液的实验室诊断研究进展[J].现代检验医学杂志, 2014, 29(1): 97-100.  
Huang X, Chen J. Laboratory diagnosis of tuberculous pleural effusion [J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(1): 97-100.
- [6] 杨华夏,张丽帆,刘晓清,等.风湿性疾病的 T 细胞  $\gamma$  干扰素释放分析诊断潜伏性结核分枝杆菌感染[J].中华临床免疫和变态反应杂志, 2011, 5(2): 83-87.  
Yang HX, Zhang LF, Liu XQ, et al. T-cell interferon-gamma release assays to detect latent tuberculosis infection in rheumatic diseases [J]. Chinese Journal of Allergy Clinical & Immunology, 2011, 5(2): 83-87.
- [7] Erdozain JG, Ruiz-Iratorza G, Egurbide MA, et al. High risk of tuberculosis in systemic lupus erythematosus? [J]. Lupus, 2006, 15(4): 232-235.
- [8] Hauck FR, Neese BH, Panchal AS, et al. Identification and management of latent tuberculosis infection [J]. Am Fam Physician, 2009, 79(10): 879-886.
- [9] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告 [J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.  
Technical Guidance Group of the Fifth National TB Epidemiologic Survey, The Office of the Fifth National TB Epidemiological Survey. The fifth national tuberculosis epidemiological survey in 2010 [J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2012, 34(8): 485-508.
- [10] 张弛,吴俊英,杨倩婷,等.深圳市 2013 年门诊结核病人流行病学调查分析 [J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(9): 1560-1563.

(下转 29 页)

(上接 25 页)

- Zhang C, Wu JY, Yang QT, et al. Investigation on epidemiology of outpatient with tuberculosis in Shenzhen[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2015, 20(9): 1560-1563.
- [11] 王秀丽, 张乐平, 汪远红. 抗结核药物治疗老年肺结核患者的不良反应及防治方法[J]. 中国医药, 2013, 5(3): 223-224.
- Wang XL, Zhang LP, Wang YH. Analysis and prevention of adverse reaction of anti-tuberculosis drugs in elderly patients[J]. China Medicine, 2013, 5(3): 223-224.
- [12] Amanatidou V, Syridou G, Mavrikou M, et al. Latent tuberculosis infection in children: diagnostic approaches[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(7): 1285-1294.
- [13] Matulis G, Juni P, Villiger PM, et al. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune diseases: performance of a *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific interferon gamma assay[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(1): 84-90.
- [14] Bocchino M, Matarese A, Bellofiore B, et al. Performance of two commercial blood IFN-gamma release assays for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection in patient candidates for anti-TNF-alpha treatment[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008, 27(10): 907-913.
- [15] 王铁山, 齐墨词. 比较四种实验室辅助检查方法在肺结核诊断中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 134-137.
- Wang TS, Qi MC. A comparative study on four methods in the diagnosis of tuberculosis[J]. J Mod Lab Med, 2016, 31(1): 134-137.

收稿日期: 2016-10-26

修回日期: 2016-12-02