

两种全血 γ -干扰素释放试验试剂盒在结核病诊断中的比较研究

陈雪林 崔嘉 刘宇 马亮亮 邢俊蓬 张颖颖 任海涛 黑文明

【摘要】 **目的** 比较两种 γ -干扰素释放试验(IGRA)检测试剂盒在结核病诊断中的性能,探讨 IGRA 的临床应用价值。**方法** 采集结核病患者、健康志愿者的外周血,分别用武汉海吉力生物科技有限公司研制的结核杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒(酶联免疫吸附法)(简称海吉力试剂)和北京万泰生物药业有限公司生产的结核杆菌相关 γ -干扰素检测试剂盒(体外酶联免疫法)(简称万泰试剂)进行检测,比较两种检测试剂的诊断性能(配对 χ^2 检验)、一致性(Kappa 检验),并分析其结果。**结果** 共检测结核病患者 270 例(其中菌阳 122 例、菌阴 148 例,老年 60 例、中青年 210 例)、健康志愿者 161 例。海吉力试剂的敏感性为 81.5%,特异性为 90.1%,万泰试剂的敏感性为 79.6%,特异性为 88.8%,二者的敏感性或特异性没有统计学差异(P 值为 0.441 或 0.845, $P > 0.05$)。两种检测结果一致率为 87.7%,Kappa 值为 0.752 ($P < 0.01$)。海吉力试剂、万泰试剂对菌阳结核患者的敏感性为 81.1%、78.7%,与对菌阴结核患者的敏感性 81.8%、80.4%比较,差异均没有统计学意义($P > 0.05$);二者对老年结核患者的敏感性为 71.7%、70.0%,与对中青年结核患者的敏感性 84.3%、82.4%比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 海吉力试剂与万泰试剂对结核病的诊断性能相当,二者具有较好的一致性。IGRA 对菌阴结核病、糖尿病合并结核病、激素治疗结核患者的应用价值更高,对老年结核病的诊断价值相对较低。

【关键词】 结核; 诊断; 干扰素 II 型; 老年人

Comparison of two novel detection kits for IFN- γ release assay in patients with TB CHEN Xue-lin, CUI Jia, LIU Yu, MA Liang-liang, XING Jun-peng, ZHANG Ke-ke, REN Hai-tao, HEI Wen-ming. Department of Infectious Disease, Beijing Geriatric Hospital, Beijing 100095, China
Corresponding author: CHEN Xue-lin, Email: chenxuelin.1971@163.com

【Abstract】 **Objective** To compare the diagnostic performance of two detection kits for interferon-gamma(IFN- γ) release assay(IGRA) on tuberculosis(TB), discuss the clinical value of IGRA. **Methods** The serum specimens of 270 TB patients (including 122 bacterial-positive TB patients and 148 bacterial-negative TB patients) and 161 healthy individuals with low risk of exposure were detected by Mycobacterium Tuberculosis Specific Cell Mediated Immune Response Detection Kit(ELISA) (HG-IGRA, Wuhan Hygeianey Bioscience Co. Ltd.) and Diagnostic Kit for Mycobacterium tuberculosis correlative IFN- γ release assay(TB-IGRA, Beijing Wantai Biological Pharmacy Co. Ltd.), respectively. Compare the sensitivity or specificity and evaluate the agreement between the two kits. **Results** The sensitivity and specificity of HG-IGRA were 81.5% and 90.1%, compared with 79.6% and 88.8% for TB-IGRA. There were no significant differences in sensitivity or specificity ($P > 0.05$). In total 431 patients, the tested agreement between the two kits was 87.7% with a Kappa value of 0.752 ($P < 0.01$). There were no significant differences in sensitivity of HG-IGRA or TB-IGRA between bacterial-positive TB patients and bacterial-negative TB patients($P > 0.05$). There were significant differences in sensitivity of HG-IGRA or TB-IGRA between elderly TB patients and non-elderly TB patients($P < 0.05$). **Conclusion** HG-IGRA and TB-IGRA had the same diagnostic performance on TB, they had good consistency. The clinical value of IGRA was high in the bacterial-negative or low-immunity TB patients, and was low in the elderly TB patients.

【Key words】 Tuberculosis; Diagnosis; Interferon type II; Aged

结核病是由结核分枝杆菌(简称结核杆菌)引起的一种慢性传染病,是全球范围内感染性疾病的头号杀手。目前结核病的主要确诊手段是细菌学检测和病理学诊断,其中涂片法抗酸杆菌阳性率低达14.6%,快速培养法阳性率31.7%,特异性83.5%^[1],而传统的结核杆菌罗氏培养阳性率虽稍高一点,但检测周期长,对菌阴结核病的诊断仍然困难,因此寻找一种准确、快速、可靠的诊断结核病方法十分迫切。近年来,以T细胞免疫为基础的体外 γ -干扰素释放试验(interferon- γ release assays, IGRA)被证实可在结核杆菌感染检测中具有较好的特异性和敏感性^[2],在欧美等发达国家已经开始用于活动性结核的诊断^[3-5]。国内关于IGRA在结核病诊断中的应用研究不断增多,但绝大多数用的是进口试剂,价格昂贵,因此IGRA检测试剂需要国产化。武汉海吉力生物科技有限公司新研制的结核杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒(酶联免疫吸附法)(简称海吉力试剂),与北京万泰药业有限公司生产的结核杆菌相关 γ -干扰素检测试剂盒(体外酶联免疫法)(简称万泰试剂)的检测原理一致^[6],均选取了卡介苗及大多数非结核分枝杆菌没有的6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6)和10-kDa culture filtrate protein (CFP-10)作为结核杆菌特异性抗原^[7],均可用于结核杆菌潜伏感染或活动结核病的辅助诊断。本研究对海吉力试剂与万泰试剂在结核病诊断中的敏感性、特异性、一致性进行分析,结合临床资料探讨IGRA对结核病患者的诊断价值。

对象与方法

1. 对象:于2013年1至5月在北京老年医院和湖北工业学院招募研究对象,并获得受试者知情同意。入组结核病患者270例(结核组),结核病的诊断标准参见文献^[8],综合考虑临床影像学表现、组织病理学、抗结核治疗效果等,其中菌阳结核病122例(菌阳组),菌阴结核病148例(菌阴组),男180例,女90例,年龄15~90岁,中位年龄38.5岁,包括肺结核220例,结核性胸膜炎31例,肺外结核19例。入组健康志愿者161例(健康组),经问卷调查来自结核杆菌低暴露风险人群,均无临床症状,无结核病接触史,胸部X线检查正常,结核菌素试验阴性,其中男130例,女31例,年龄17~27岁,中位年龄20.0岁。结核组中糖尿病合并结核病40例,激素治疗19例,老年(≥ 65 岁)60例,中青年(< 65 岁)210例,每位患者录入抗结核治疗时间,以便进一步分组讨论。

2. 仪器和试剂: Mutiskan MK3 型酶联免疫检测仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司生产。海吉力

试剂与万泰试剂。

3. 方法:海吉力试剂检测步骤:受试者用BD肝素锂抗凝采血管抽取5 ml 静脉血,马上轻柔颠倒混匀3次以上,使抗凝剂充分溶解。3 h 内将采集的全血分装到3种不同的培养管中,“T”为添加了结核特异性抗原ESAT-6、CFP-10的测试培养管,“N”为本底对照培养管,“P”为添加了非特异刺激原植物凝血素(PHA)的阳性对照培养管,每种培养管分装1 ml,分装前需要颠倒混匀3次以上,分装后轻柔颠倒培养管5次并立刻置于37℃培养箱中,静置培养(22±2) h 后取出,离心收集上清液,然后用双抗体夹心法定量检测上清中 γ -干扰素的含量,最后计算刺激培养系统中特异性升高的 γ -干扰素的量来判定是否为结核杆菌感染阳性。 γ -干扰素检测流程中洗板3轮次,结果判定的参考值如下: $N \leq 8$, $T-N \geq 0.35$ 并且 $\geq N/4$, 阳性; $N \leq 8$, $P-N \geq 0.5$, $T-N < 0.35$ 或 ≥ 0.35 但 $< N/4$, 阴性; $N \leq 8$, $P-N < 0.5$, $T-N < 0.35$, 不确定。

万泰试剂(批号TR20121205)检测步骤(按说明书方法进行):受试者同时用BD肝素锂抗凝采血管抽取5 ml 静脉血,步骤基本同上,但 γ -干扰素检测流程中仅洗板1轮次,结果判定的参考值如下: $N \leq 400$, $T-N \geq 14$ 并且 $\geq N/4$, 阳性; $N \leq 400$, $P-N \geq 20$, $T-N < 14$ 或 ≥ 14 但 $< N/4$, 阴性; $N \leq 400$, $P-N < 20$, $T-N < 14$ 或 ≥ 14 但 $< N/4$, 不确定; $N > 400$, 不确定。

4. 统计学分析:所有数据均采用SPSS 13.0软件包进行分析。计数资料采用 χ^2 检验,两种诊断试验的一致性检验用Kappa值,检验水准为 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1. 海吉力试剂与万泰试剂的敏感性和特异性比较:海吉力试剂和万泰试剂的检测阳性率结果见表1,二者阳性率差异用配对 χ^2 检验,每组 P 均 > 0.05 ,差异都没有统计学意义。其中海吉力试剂的敏感性为81.5%,万泰试剂的敏感性为79.6%,二者差异没有统计学意义($P=0.441$),海吉力试剂的特异性为90.1%(1-9.9%),万泰试剂的特异性为88.8%(1-11.2%),二者差异没有统计学意义($P=0.845$),表明两种试剂的诊断性能相当。

表1 海吉力试剂与万泰试剂的检测阳性率比较

组别	海吉力试剂	万泰试剂	P 值
结核组	81.5%(220/270)	79.6%(215/270)	0.441
菌阳组	81.1%(99/122)	78.7%(96/122)	0.508
菌阴组	81.8%(121/148)	80.4%(119/148)	0.815
健康组	9.9%(16/161)	11.2%(18/161)	0.845

2. 海吉力试剂与万泰试剂的一致性比较: 两种试剂同时检测的 431 例样本中, 均为阳性 208 例, 均为阴性 170 例, 结果一致率为 87.7% (378/431), $Kappa$ 值为 0.752, U 值为 15.62 ($P < 0.01$), 表明两种诊断试剂具有较好的一致性。

3. 无法确定结果、海吉力试剂与万泰试剂不一致结果的处理: 有 1 例无法确定结果, 经重新抽血用海吉力试剂与万泰试剂检测, 结果均阴性。海吉力试剂与万泰试剂不一致结果的 53 例样本中, 28 例海吉力试剂阳性而万泰试剂阴性, 25 例海吉力试剂阴性而万泰试剂阳性, 其中 31 例经澳大利亚 Cellestis 有限公司生产的 QuantiFERON®-TB 试剂盒 (简称 QFT 试剂) 再次检测, 结果 18 例与海吉力试剂一致、13 例与万泰试剂一致。

4. 其他结果 (表 2, 3): 菌阴组与菌阳组检测结果差异经 χ^2 检验, 海吉力试剂 $P = 0.898$ ($\chi^2 = 0.016$), 万泰试剂 $P = 0.727$ ($\chi^2 = 0.122$), 均没有统计学意义。海吉力试剂对肺结核、结核性胸膜炎、肺外结核患者检测的敏感性分别为 81.4%、80.6%、84.2%, 之间差异经 χ^2 检验, $P = 0.946$ ($\chi^2 = 0.110$); 万泰试剂对肺结核、结核性胸膜炎、肺外结核患者检测的敏感性分别为 78.2%、83.9%、89.5%, 之间差异经 χ^2 检验, $P = 0.414$ ($\chi^2 = 1.763$)。海吉力试剂与万泰试剂对糖尿病合并结核病患者检测的敏感性分别为 80.0% (32/40)、72.5% (29/40), 与结核组非糖尿病比较, 没有统计学差异 (海吉力试剂 $P = 0.794$, 万泰试剂 $P = 0.225$)。海吉力试剂与万泰试剂对激素治疗结核病患者检测的敏感性分别为 84.2% (16/19)、94.7% (18/19), 与结核组无激素治疗比较, 没有统计学差异 (海吉力试剂 $P = 0.751$, 万泰试剂 $P = 0.090$)。

表 2 对老年结核病患者与中青年结核病患者检测的敏感性比较

组别	海吉力试剂	万泰试剂
老年结核病患者	71.7%(43/60)	70.0%(42/60)
中青年结核病患者	84.3%(177/210)	82.4%(173/210)
χ^2 值	4.925	4.410
P 值	0.026	0.036

讨 论

随着比较基因组学的研究, 发现结核分枝杆菌

RD1 基因区域中 rv3875 和 rv3874 编码的 ESAT-6 和 CRP-10 两种蛋白是结核特异性蛋白抗原, 存在于致病性结核分枝杆菌中, 大多数非结核分枝杆菌包括鸟胞内分枝杆菌和 BCG 中不存在, 仅个别不常见的非结核分枝杆菌如 *M.szulgai*、*M.marium*、*M.kansasii* 可能造成交叉反应^[9]。ESAT-6 和 CRP-10 具有很强的细胞免疫活性, 是 T 细胞靶抗原, 能诱导细胞免疫反应产生高水平的 γ -干扰素^[10]。近年来已有大量应用 ESAT-6、CRP-10 及两者融合蛋白包括肽段为抗原的 T 细胞 γ -干扰素释放试验的研究, 主要有两种方法, 一种是以酶联免疫吸附法检测外周血 γ -干扰素水平的 QuantiFERON-TB GOLD In Tube (QFT-GIT) 试验, 另一种是以酶联免疫斑点法检测外周血分泌 γ -干扰素的 T 淋巴细胞数量的 T-SPOT.TB (T-SPOT) 试验^[7]。本研究使用的海吉力试剂与万泰试剂属前一种方法, 因其选取了存在于结核分枝杆菌, 但在卡介苗和大多数非结核分枝杆菌中普遍缺失的 RD1 区编码的 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白, 应用基因工程技术将其表达成为试剂盒中应用的结核分枝杆菌特异性刺激抗原, 所以有较高的特异性。新研制的海吉力试剂诊断结核病的特异性为 90.1%, 较为理想, 而国产万泰试剂的特异性为 88.8%, 均略低于国外的相关报道^[2-5,11], 但高于刘佳文等^[6]报道的万泰试剂特异性 83.3% 和王莹等^[12]报道的 IGRA 特异性 77.8%, 可能与健康志愿者的入选标准有关。

最新的系统综述和 Meta 分析^[11]中 IGRA/ELISA (QFT-GIT) 对活动性结核病诊断的敏感性为 81% (95% CI, 78%~83%), 本研究中海吉力试剂对结核病患者检测的敏感性为 81.5%, 结论一致, 而万泰试剂对结核病患者检测的敏感性为 79.6%, 虽稍低, 但差异没有统计学意义 (表 1, $P > 0.05$), 可能说明两种检测试剂的操作方法和结果判定的临界值有细微差别。本研究中两种试剂对菌阴结核病患者检测的敏感性均稍高于对菌阳结核病患者检测的敏感性 (表 1), 差异均没有统计学意义 ($P > 0.05$), 但有临床意义, 有助于缓解菌阴结核病的诊断难题, 提示 IGRA 对菌阴结核病的诊断价值较高, 目前少见类似报道。

本研究中海吉力试剂和万泰试剂对肺外结核患者检测的敏感性高达 84.2% 和 89.5%, 而肺外结核多为菌阴结核, 同样提示 IGRA 对肺外结核的诊断具有较高的临床应用价值, 这与国外的报道^[13]一致, 且可用于

表 3 不同治疗时间的结核病患者用两种试剂检测的敏感性 (%)

组别	0~6 d	7~29 d	1~2 个月	2~3 个月	3~4 个月	4~6 个月	6~9 个月	9~12 个月	>12 个月
海吉力试剂	84.5	77.8	72.2	69.2	88.2	88.9	78.6	83.1	72.2
万泰试剂	82.9	77.8	72.2	69.2	88.2	88.9	71.4	87.5	61.1

检测支气管肺泡灌洗液、痰液、胸腹水、脑脊液等。另外糖尿病可引起机体的免疫功能受损,在糖尿病合并结核病患者中,海吉力试剂与万泰试剂检测的敏感性与结核组非糖尿病比较,均没有统计学差异($P>0.05$);在激素治疗的结核病患者中,海吉力试剂与万泰试剂检测的敏感性与结核组无激素治疗比较,均没有统计学差异($P>0.05$);提示在免疫力低下或受抑制患者中 IGRA 比既往结核菌素试验、结核抗体等血清学检测更具有临床应用价值,国外有类似报道^[14],且对于疑似活动性结核感染者,IGRA 可作为一种有用的排除标准。

有研究显示 IGRA 检测的结果会受年龄、营养不良、癌症化疗、TB-HIV 双重感染等多种因素的影响^[15]。本研究中大于 65 岁的老年结核病患者,用海吉力试剂和万泰试剂检测的敏感性低于对中青年结核病患者检测的敏感性,差异有统计学意义($P<0.05$, 表 2),表明 IGRA 对老年结核病的临床诊断价值相对较低。初步分析原因,可能与合并脑卒中后遗症、营养不良等因素有关,需扩大检测样本量进一步研究。若老年结核病患者所占比例扩大,则整个结核组的检测敏感性可能下降。

此外,本研究中患者抗结核治疗时间对 IGRA 检测结果的影响较复杂,初步分析,未治疗及治疗小于 1 周、治疗 3~6 个月、治疗 9~12 个月患者 IGRA 检测的敏感性高于平均水平(表 3, 多个高峰),治疗 1 周后、治疗大于 6 个月患者检测的敏感性有下降趋势,治疗 12 个月以上患者检测的敏感性最低。而国外相关报道^[16]中,IGRA 敏感性高峰时间为治疗前,与本研究结果相似,未出现其他敏感性高峰时间。提示早期的强化抗结核治疗可能对患者结核杆菌特异性细胞免疫反应有影响,而晚期 IGRA 结果可能有助于疗效判断,需进一步细化研究。

综上所述,海吉力试剂与万泰试剂对结核病的诊断性能相当,二者具有较好的一致性。 γ -干扰素释放试验不失为快速、有效诊断各型结核病的辅助手段,尤其对菌阴结核病、糖尿病合并结核病、激素治疗结核病患者的应用价值更高,但可能受到合并疾病、治疗时间等因素的影响,对老年结核病患者应用价值相对较低。目前该技术的国产试剂价格更低,更适宜推广应用。

志谢 作为横向科研项目(鄂发改投资函[2012]第 777 号)乙方,感谢甲方武汉海吉力生物科技有限公司及其科研人员张雷、陈银芳、随霞、兰云飞等

的鼎力支持。感谢北京医捷通科技有限公司朱永琴、韩嵩的协助

参 考 文 献

- [1] 吴龙章, 蔡杏珊, 吴幸怡, 等. 四种检测方法对结核病临床诊断价值的探讨. 中华检验医学杂志, 2007, 30: 742-745.
- [2] Lui G, Lee N, Cheung SW, et al. Interferon gamma release assay for differentiating tuberculosis among pneumonia cases in acute healthcare setting. *Infection*, 2011, 62: 440-447.
- [3] Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir*, 2011, 37: 100-111.
- [4] Pai M, Joshi R, Bandyopadhyay M, et al. Sensitivity of a whole-blood interferon-gamma assay among patients with pulmonary tuberculosis and variations in T-cell responses during anti-tuberculosis treatment. *Infection*, 2007, 35: 98-103.
- [5] Bandyopadhyay M, Bhakta A, Chakrabarty S, et al. Clinical and bacteriological correlates of whole blood interferon gamma (IFN- γ) in newlydetected cases of pulmonary TB. *Asian Pacific. Journal of Tropical Medicine*, 2010, 3: 224-231.
- [6] 刘佳文, 康丽军, 翁绳凤, 等. 干扰素体外释放酶联免疫法在结核病诊断中的价值. 中国防痨杂志, 2011, 33: 600-603.
- [7] 张立华, 靳文香, 贾红彦, 等. T-SPOT 与结核菌素试验对结核病患者临床诊断价值[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6: 4107-4108.
- [8] 卫生部疾病预防控制局和医政司, 中国疾病预防控制中心. 中国结核病防治规划实施工作指南(2008 版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009.
- [9] Jones S, de Gijssel D, Wallach FR, et al. Utility of QuantiFERON-TB Gold in-tube testing for latent TB infection in HIV-infected individuals. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11:1190-1195.
- [10] Yotsumoto H. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis infection. *Rinsho Byori*, 2008, 56: 1026-1033.
- [11] Diel R, Loddenkemper R, Neinhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest*, 2010, 137: 952-968.
- [12] 王莹, 阳幼荣, 尹文东, 等. 全血 γ -干扰素释放试验对活动性结核病的辅助诊断价值. 标记免疫与临床, 2012, 19: 193-197.
- [13] Lee LN, Chou CH, Wang JY. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15: 173-179.
- [14] Matulis G, Juni P, Villiger PM, et al. Detection of latent tuberculosis in immunosuppressed patients with autoimmune disease: performance of a Mycobacterium tuberculosis antigen-specific interferon gamma assay. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67: 84-90.
- [15] Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube assay, and T-Spot. TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest*, 2009, 135: 1010-1018.
- [16] Chee CB, KhinMar KM, Gan SH, et al. Tuberculosis treatment effect on T-cell interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens. *Eur Respir*, 2010, 36: 355-361.

(收稿日期: 2013-11-27)

(本文编辑: 戚红丹)