

# T 淋巴细胞干扰素释放试验在检测结核杆菌感染中的应用

陈芳, 项忠元

中南大学湘雅二医院检验科, 湖南 长沙 410011

**摘要:** **目的** 评价 T 淋巴细胞干扰素释放试验 (T-SPOT. TB) 快速诊断结核病的临床应用价值, 并尝试确定新 T-SPOT. TB 的阳性临界值, 来降低 T-SPOT. TB 检测方法对非结核感染的误诊率。 **方法** 选择结核分枝杆菌感染的患者 31 例, 非结核感染疾病病例 96 例, 分别以早期分泌的抗原靶体-6KD, 即抗原 A (early secreted antigenic target 6, ESAT-6) 和培养滤过蛋白-10KD, 即 B 抗原 (culture filtrate protein 10, CFP-10) 作为刺激原, 培养 16~20 h, 应用 T-SPOT. TB 检测特异性 T 淋巴细胞释放的干扰素- $\gamma$ , 并对敏感度和特异度进行分析, 找出 T-SPOT. TB 检测的阳性临界值。 **结果** 以厂家提供阳性临界值为 6 SFU 的诊断标准在 31 例结核分枝杆菌感染患者中, 28 例结核感染患者 T-SPOT. TB 阳性, 敏感度为 90.3%, 非结核感染疾病组 96 例, 88 例 T-SPOT. TB 阴性, 特异度为 91.7%, 将结核感染病例组做受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 表明, 当 T-SPOT. TB 阳性临界值为 15 SFU 时, 敏感度为 86.9%, 特异度为 93.1%。 **结论** 运用 T-SPOT. TB 检测试剂作为结核感染的检查, 具有较好的敏感度和特异度, 但若选择产家提供的检测阳性临界值为 6 SFU, 在本院容易引起疑似患者的误诊, 因此根据试验结果得出 T-SPOT. TB 检测阳性临界值应定为 15 SFU, 敏感度为 86.9%、特异度为 93.1%, 这样可以尽量减少疑似患者的误诊。

**关键词:**  $\gamma$  干扰素释放实验; 结核分枝杆菌; T-SPOT. TB; 阳性临界值

**中图分类号:** R378.91<sup>+</sup>1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)03-0272-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.03.005

## Application of T cell interferon gamma release assay in detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection

CHEN Fang, XIANG Zhong-yuan

Department of Clinical Laboratory, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410011, China

Corresponding author: XIANG Zhong-yuan, E-mail: shangshangone@163.com

**Abstract:** **Objective** To evaluate the clinical application value of T cell interferon- $\gamma$  release assay (T-SPOT. TB) in the rapid diagnosis of tuberculosis and to try to identify its new cut-off value so as to decline its misdiagnosis rate. **Methods** Thirty-one patients with *Mycobacterium tuberculosis* infection and 96 patients with non-TB diseases were enrolled. Antigen A (early secreted antigenic target-6, ESAT-6) and antigen B (culture filtrate protein-10, CFP-10) were used for the stimuli, and then cultured for 16-20 hours. T-SPOT. TB assay was used to detect interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) released by the specific T cells, and its sensitivity and specificity were analyzed. The critical value of T-SPOT. TB assay was identified. **Results** When the cut-off value of 6 SFU recommended by the manufacturer of the reagent was considered as the diagnostic standard, 28 out of 31 patients with *Mycobacterium tuberculosis* infection were T-SPOT. TB positive, with the sensitivity of 90.3%, and 88 of 96 patients with non-TB diseases were T-SPOT. TB negative, with the specificity of 91.7%. The receiver operating characteristic curve (ROC curve) based on the tuberculosis infection group showed that when the cut-off value of T-SPOT. TB was defined as 15 SFU, the sensitivity and specificity were 86.9% and 93.1% respectively. **Conclusions** T-SPOT. TB assay in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection has a high sensitivity and specificity. But defining the cut-off value as 6 SFU suggested by the manufacturer of the reagent can easily induce misdiagnosis of suspected patients in the Second Xiangya Hospital of Central South University. Having the cut-off value as 15 SFU, the sensitivity and specificity of T-SPOT. TB assay are 86.9% and 93.1% respectively, which can decline the misdiagnosis of suspected patients.

**Key words:** interferon- $\gamma$  release assay; *Mycobacterium tuberculosis*; T-SPOT. TB; cut off value

全球结核分枝杆菌感染再次大面积出现, 以及多

**作者简介:** 陈芳, 女, 湖南湘潭人, 硕士, 主管技师, 主要从事医疗卫生检验工作。

**通信作者:** 项忠元, E-mail: shangshangone@163.com。

耐药结核分枝杆菌的出现迫切需要新型的诊断方法和预防策略, 而且由于人口大规模的全球流动, 极大增加整个人群结核分枝杆菌活动性感染和结核分枝杆菌潜伏性感染的概率<sup>[1]</sup>。现在诊断结核感染的方法多为

结核菌素皮肤试验 (tuberculin skin test, TST), 由于采用纯化蛋白衍生物作为抗原, 包括卡介苗和非结核分枝杆菌抗原存在广泛交叉反应, 从而限制 TST 的特异性。这促使人类开发新型体外诊断试验, 其方法是根据检测活化的 T 淋巴细胞释放干扰素- $\gamma$ , 其抗原是大多数环境中存在的分枝杆菌分离株, 包括卡介苗缺失的结核分枝杆菌, 这些菌株中存在 RDI 基因编码分泌蛋白, 其中两种低分子量分泌蛋白早期分泌的抗原靶体-6KD, 即 ESAT-6 (early secreted antigenic target 6) 和培养滤过蛋白-10KD, 即 CFP-10 (culture filtrate protein 10), 这两种蛋白为结核杆菌所特有, 其它分枝杆菌、卡介苗均无, 因此检测这两种蛋白不会受到交叉反应的影响<sup>[2]</sup>。大量的临床研究证实采用 ESAT-6 和 CFP-10 多重抗原表位的商品化 ELISPOT 试剂盒具有较高敏感性和特异性。本实验用 IGRAs 中的一种 T-SPOT. TB 检测技术检测结核分枝杆菌感染患者, 并评价 T-SPOT. TB 对诊断结核病的辅助检查意义<sup>[3]</sup>。

## 1 对象与方法

1.1 对象 选取 2015 年 9-12 月在中南大学湘雅附二医院住院和门诊的符合《肺结核诊断标准 (WS288-2008)》中临床诊断和确诊的病人作为研究对象, 其中确诊结核分枝杆菌感染患者 31 例, 结核杆菌培养阳性 (金标准) 或痰检抗酸抗菌阳性, 其中男性 18 例, 女性 15 例, 平均年龄 55.78 岁。非结核杆菌感染组 96 例, 临床表现及辅助检查后明确系其他疾病所致, 或者经其他治疗 (未经抗结核治疗) 病情改善, 其中男性 47 例, 女性 49 例, 平均年龄 55.21 岁。以上所有研究对象均无严重免疫缺陷、妊娠及严重的肝肾功能衰竭史。

1.2 试剂及仪器 本实验所用试剂为 T-SPOT. TB 检测试剂盒, 美国 Oxford Immunotec 公司生产。所用仪器: ESCO 二级生物安全柜, 美国 LABCONCO 公司; CO<sub>2</sub> 培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 冷冻离心机, 翔鹰医疗器械有限公司。

1.3 外周血单个核细胞的分离和计数 采集 4 ml 外周血标本于肝素钠为抗凝剂的真空采血管内, 并轻轻颠倒 5 次。将 4 ml 血液和 4 ml 培养液充分混匀加入到单个核细胞分离液上层, 放置在冷冻离心机内, 以 1 000 g 离心 22 min。取出后, 用吸管吸取中间白色云雾层, 即单个核细胞层, 加入到 8~10 ml 培养液内混匀, 在冷冻离心机内以 600 g 离心 7 min。取出弃上清、扣干, 再加少量 1640 培养液混匀沉淀, 吸取沉淀混匀液加入到 8~10 ml 1640 培养液中混匀, 在冷冻离心机内以 350 g 离心 7 min, 弃上清, 扣干, 加 620  $\mu$ l AIM

混匀, 取出 120  $\mu$ l 在 SYSMEX XN-20 血细胞分析仪上进行淋巴细胞计数, 得到细胞数根据厂家给出的配制 25 万细胞数的表格进行配制、孵育。

### 1.4 体外 T-SPOT. TB 方法检测 T 细胞释放的干扰素- $\gamma$

1.4.1 检测过程 在包被有干扰素- $\gamma$  抗体的反应池中分别加入 50  $\mu$ l 的阳性质控、抗原 a (ESAT-6)、抗原 b (CFP-10) 和作为阴性对照的 AIM, 再向每个反应池加入 100  $\mu$ l 的 25 万淋巴细胞数的培养液, 在 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱内孵育 16~20 h。经 PBS 液连续洗涤 5 次, 再加入二抗, 在 4  $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。经 PBS 液连续洗涤 5 次, 加入黑暗保存的底物工作液 50  $\mu$ l, 室温孵育 7 min。用蒸馏水或者去离子水充分洗涤反应池的内部。放置于黑暗并且通风良好的地方干燥或者放置 37  $^{\circ}$ C 孵育箱内干燥。用检测仪器观察斑点数量<sup>[4]</sup>。

1.4.2 T-SPOT. TB 结果判断 结果判断以厂家提供的为标准, 即阴性对照反应池斑点数为 0~5 SFU 时, 任何一个检测反应池斑点计数-阴性对照反应池斑点计数不小于 6 SFU 判断为阳性。如果阴性对照反应池斑点数为 6~10 SFU 个或更多时, 报告斑点数= (抗原 A 或抗原 B 反应池的斑点数) - 2 $\times$  (阴性对照反应池斑点数) - 6<sup>[9]</sup>。见图 1。

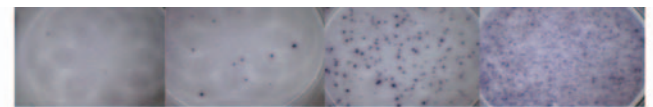


图 1 T 淋巴细胞干扰素释放试验各反应池典型结果

1.5 统计学分析 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析试验结果所需要的受试者工作特征曲线和 kappa 系数, 检测结果采用卡方检验分析检测的不同值,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。用 kappa 系数分析实验与实际情况的符合性, 一般认为 0.4 < K < 0.75 为中度一致, K  $\geq$  0.75 一致性极佳, K  $\leq$  0.4 时一致性差。

## 2 结果

2.1 T-SPOT. TB 检测结果 以厂家提供的阳性临界值为 6 SFU 诊断标准: 确诊结核感染组有 28 例 T-SPOT. TB 阳性, 3 例 T-SPOT. TB 阴性, 灵敏度为 90.3%; 无关疾病组中, 有 8 例 T-SPOT. TB 阳性, 88 例阴性, 特异度为 91.7%, 见表 1。

表 1 两组研究对象结核感染诊断情况与 T-SPOT. TB 检测结果

| 组别     | T-SPOT. TB (+) | T-SPOT. TB (-) | 合计 | 阳性率 (%) |
|--------|----------------|----------------|----|---------|
| 结核感染组  | 28             | 3              | 31 | 90.3    |
| 非结核感染组 | 8              | 88             | 96 | 8.3     |

注: T-SPOT. TB (+) 表示 T-SPOT. TB 检测阳性, T-SPOT. TB (-) 表示 T-SPOT. TB 检测阴性。

2.2 T-SPOT. TB 检测方法阳性临界值 见图 2、表 2。当 T-SPOT. TB 的阳性临界值从 6 SFU 提高到 15 SFU 时,敏感度降低、特异度提高,在 T-SPOT. TB 阳性临界值为 15 SFU 时是 ROC 曲线得出的敏感度与特异度之和最佳的点。采用 Kappa 系数来评价可靠性,当选择 T-SPOT. TB 阳性临界值(SFU)为 6 时,Kappa 值为 0.764,当选择 T-SPOT. TB 阳性临界值(SFU)为 15 时,Kappa 值为 0.822。两个阳性值的 Kappa 值 > 0.75,可以确定新的阳性临界值的 T-SPOT. TB 试验方法的可靠性更高。

表 2 不同 T-SPOT. TB 阳性临界值时敏感度和特异度

| T-SPOT. TB 阳性临界值(SFU) <sup>a</sup> | 敏感度(%) | 特异度(%) |
|------------------------------------|--------|--------|
| 6                                  | 90.3   | 91.6   |
| 15                                 | 86.9   | 93.1   |
| 18                                 | 84.3   | 94.2   |

注:a. SFU 为反应池中斑点的单位。

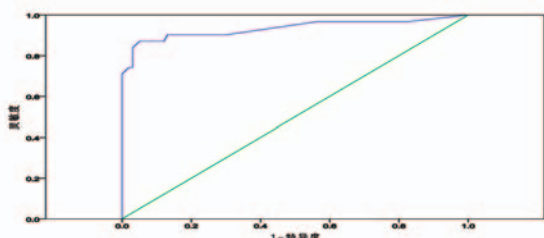


图 2 T-SPOT 诊断结核的 ROC 曲线

### 3 讨论

近些年来结核病疫情呈显著上升趋势,在全球所有传染性疾病中,结核病已成为成年人的首位死因之一。对于感染结核的患者进行早期诊断、早期治疗是改善患者预后的关键所在,也是控制结核播散的重要环节之一。TST 是临床常用的筛查结核分枝杆菌感染的免疫学方法,因其操作简单、快速,在临床上被广为应用,并且常作为抗结核治疗的依据,但 TST 检测结果有较高的假阳性和假阴性。细菌学是诊断结核的金标准,但常规培养需要 2 个月的时间,BACTEC 法一般也须两周才能分离出分枝杆菌,而且阳性率取决于采集标本中细菌的数量以及操作的规范,不利于早期诊断与早期治疗。血清学诊断为结核病的快速辅助诊断手段之一,但特异性欠强,敏感性较低。体外核酸扩增技术即聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)自 1989 年法国学者 Brissonneol 等首先报道用于诊断结核病,为结核病的快速诊断开辟了新途径,但由于其假阳性率较高影响了结果的可靠性,其临床应用受到了一定的限制<sup>[5]</sup>。

结核分枝杆菌感染的免疫反应主要是细胞介导免疫反应,作为细胞介导免疫反应的一部分,T 细胞被结核分枝杆菌抗原致敏,这些抗原再次刺激机体时,活化

T 细胞会产生干扰素  $\gamma$ ,这些细胞主要为 CD4 和 CD8<sup>[2]</sup>。大量研究表明,结核特异性抗原 ESAT-6 和 CFP-10 可以作为结核分枝杆菌感染的一种可靠的标志物。并且鉴定这两种低分子量分泌蛋白为 T 细胞检测技术诊断临床结核分枝杆菌感染奠定了基础<sup>[6]</sup>。ELISPOT 是目前检测 T 细胞反应最灵敏的方法。ELISPOT 和结核特异抗原整合结核感染诊断技术是 T-SPOT. TB。通过使用结核分枝杆菌抗原特异性 ESAT-6 和 CFP-10,降低与 BCG 疫苗和多种环境结核分枝杆菌的交叉反应,提高检测的特异性。两种抗原多肽制备联合应用可提高检测的敏感性。但是此实验方法仍然有一些缺陷,它虽然基本不受年龄、性别、感染部位等影响<sup>[7]</sup>,但是在 CD4<sup>+</sup>细胞低于 100/ $\mu$ l 时,T-SPOT. TB 的敏感性会降低<sup>[4]</sup>,同时在婴儿时期由于免疫系统发育不完全也会降低 T-SPOT. TB 敏感性<sup>[8]</sup>。

本实验对 31 例结核感染病例、96 例无疾病病例进行 T-SPOT. TB 检测,结果显示结核感染病例组和非结核感染病例组的检测敏感度为 90.3%、特异度为 91.8%,说明 T-SPOT. TB 试验对确诊病例与无病例的分辨能力是很强的。根据结核感染病例组的 ROC 曲线可以把 T-SPOT. TB 的阳性临界值提高到 15 SFU 时,T-SPOT. TB 的敏感度为 86.9%、特异度为 93.1%,此时敏感度降低,但是特异度增加,因此选择阳性临界值为 15 SFU 时的方法能减少结核的误诊,因此当运用欧美国家的 T-SPOT. TB 检测阳性临界值,即 T-SPOT. TB 检测斑点数  $\geq 6$  SFU 为阳性,作为检测本院就诊患者 T-SPOT. TB 阳性临界值时,检测结果会与临床有较大出入。所以,根据本试验所得结果,本院 T-SPOT. TB 检测阳性临界值应定为 15 SFU,这样可以尽量减少误诊。

### 参考文献

- [1] 张瑛,孙亚蒙,徐欣晖,等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核性疾病中的诊断价值[J]. 中华临床医师杂志,2010,12(4):2431-2434.
- [2] 祁明浩,沈凌,叶健,等.  $\gamma$  干扰素释放分析 T-SPOT 在成年人肺结核诊断中的临床价值[J]. 疾病检测,2013,28(2):115-117.
- [3] Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, et al. CXCL10/IP-10 release is induced by incubation of whole blood from tuberculosis patients with ESAT-6, CFP10 and TB7.7[J]. Microbes Infect, 2007,9(7):806-812.
- [4] Brockl, Ruhwald M, Lundgren B, et al. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon test[J]. Respir Res, 2006,7(1):1562-1566.
- [5] Al-Zamel FA. Detection and diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009,7(9):1099-1108.
- [6] 何世贵,王道峰,房三友.  $\gamma$ -干扰素释放分析 T-SPOT. TB 在结核性胸腔积液中的诊断意义[J]. 临床肺科杂志,2013,10(18):1850-1851.
- [7] 李晓非,李明武,苏俊华,等. 体外  $\gamma$ -干扰素检测结核分枝杆菌不同方法的应用价值比较[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(13):2952-2954.
- [8] 艾尼瓦尔·艾力,阿不都合力里,热木提拉,等. T-SPOT. TB 在淋巴结结核诊断中的临床价值[J]. 新疆医学,2015,10(10):1424-1425.

收稿日期:2016-09-23