

# 北京市昌平区某高校大学新生结核潜伏感染调查

杜凤娇<sup>1</sup>, 张治国<sup>2</sup>, 高铁杰<sup>2</sup>, 刘忠泉<sup>1</sup>, 陈曦<sup>1</sup>, 曹廷明<sup>1</sup>, 贾红彦<sup>1</sup>, 邢爱英<sup>1</sup>, 杜博平<sup>1</sup>, 张宗德<sup>1</sup>

1. 首都医科大学附属北京胸科医院/北京市结核病胸部肿瘤研究所 耐药结核病研究北京市重点实验室, 北京 101149;

2. 北京市昌平区结核病防治所

**摘要:** **目的** 调查大学新生结核潜伏感染情况, 以便采取预防性措施。 **方法** 2010 年 10 月随机纳入北京市昌平区某高校入学新生 TST  $\geq 10$  mm 的健康受试者 420 例, 应用 ELISPOT 检测经抗原刺激后分泌 IFN- $\gamma$  的效应 T 淋巴细胞 (即斑点形成细胞, SFCs) 数量, 并对 ELISPOT 阳性者进行为期 3 年的结核感染发病情况监测。 **结果** ELISPOT 检测 LTBI 总的阳性率为 41.2%, 在 BCG 接种 (阳性率 41.5%) 和未接种 (阳性率 40.0%) 中差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.064$ ,  $P = 0.447$ ), 在 TST 直径 10~14、15~19 和  $\geq 20$  mm 组间 (37.6%、45.4% 和 64.3%) 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 8.408$ ,  $P = 0.015$ ), 173 例未治疗的 ELISPOT+/TST+ 者经 3 年的 ATB 监测, 发病率为 0。 **结论** 北京市昌平区某高校大学新生 LTBI 比率高, 但仅以 ELISPOT 和 TST 双阳性者为预防性治疗指标, 尚不足够。

**关键词:** 结核潜伏感染; 酶联免疫斑点技术; 结核菌素皮肤试验

**中图分类号:** R521 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)09-1039-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.09.005

## Latent tuberculosis infection among freshmen in a college in Changping District, Beijing

DU Feng-jiao\*, ZHANG Zhi-guo\*, GAO Tie-jie, LIU Zhong-quan, CHEN Xi, CAO Ting-ming, JIA Hong-yan,

XING Ai-ying, DU Bo-ping, ZHANG Zong-de

\* Beijing Key Laboratory for Drug Resistant Tuberculosis Research, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University,

Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China

Corresponding author: ZHANG Zong-de, E-mail: zzd417@163.com

**Abstract:** **Objective** To investigate the prevalence of latent tuberculosis infection (LTBI) among freshmen so as to take preventive interventions. **Methods** Four hundred and twenty newly-admitted college students with positive results of tuberculin skin test (TST, diameter  $\geq 10$ mm) were randomly enrolled from a college in Changping District, Beijing in October 2010. Enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) was used to detect the peripheral blood T lymphocytes that secreted IFN- $\gamma$  after antigen stimulation, spot forming cells (SFCs), in all participants. Then the participants with positive results of ELISPOT were routinely monitored for 3 years to investigate the incidence of active tuberculosis (TB). **Results** The overall positive rate of LTBI by ELISPOT was 41.2%. No statistically significant difference was found in the positive rates of between the participants with and without BCG vaccination (41.5% vs. 40.0%,  $\chi^2 = 0.064$ ,  $P = 0.447$ ), but there were statistically significant differences in the positive rates among the groups with TST induration of 10-14 mm, 15-19 mm and  $\geq 20$  mm (37.6%, 45.4% and 64.3% respectively,  $\chi^2 = 8.408$ ,  $P = 0.015$ ). The 173 untreated students with ELISPOT+/TST+ were followed up for 3 years, and none was found to develop active TB. **Conclusions** The prevalence of latent tuberculosis infection among the freshmen of the college in Changping District, Beijing is high. Only taking ELISPOT+/TST+ as the indicators for tuberculosis prophylaxis treatment is not enough.

**Key words:** Latent tuberculosis infection; Enzyme-linked immunospot assay; Tuberculin skin test

**基金项目:** 国家科技重大专项 (2012ZX10003002); 北京市科技计划项目 (D121100003012001); 重大传染病防治协同创新中心“北京市医院管理局临床医学发展专项” (ZYLX201304)

**作者简介:** 杜凤娇 (1982-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事结核病基础研究工作, E-mail: dufj1982@163.com; 张治国 (1978-), 男, 本科学历, 副主任医师, 主要从事结核病预防控制研究工作, E-mail: zhgz8689@126.com。杜凤娇和张治国对本文有同等贡献, 并列为一作者。

**通讯作者:** 张宗德, E-mail: zzd417@163.com。

我国是结核高负担国家, 结核的发病率位于世界第 2 位, 每年新增患者约 150 万, 受感染人数约 5.5 亿<sup>[1-2]</sup>。而预防与控制结核病传播的重要手段之一, 就是尽早发现潜伏性结核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI)。欧洲推荐用两步法诊断 LTBI, 即先用结核菌素皮肤试验 (tuberculin skin test, TST), 然后对 TST 阳性者进一步通过干扰素- $\gamma$  释放试验 (interferon

gamma release assays, IGRAs) 证实 LTBI<sup>[3-4]</sup>。本研究选取北京市昌平区某高校入学新生中 TST 阳性者 420 例,采用结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 复合群基因 RDI 区域 (Rv3871 ~ Rv3879c) 中编码的早期分泌抗原靶 (early secreting antigen target 6KD, ESAT-6) 和培养滤液蛋白 (culture filtrate protein 10KD, CFP-10) 的融合蛋白 (简称 E/C 融合) 和 Rv3879c 蛋白为抗原的酶联免疫斑点检测技术 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT) 进行 LTBI 筛查,并对双阳性者进行为期 3 年的监测,探索 TST 联合 ELISPOT 检测大学新生结核潜伏感染,便于制定对策,进行干预。

## 1 对象与方法

1.1 对象 2010 年 10 月采用单纯随机抽样法抽取 TST 阳性且胸部 X 片无异常的北京市昌平区某高校大学新生 420 名,男 203 例,女 217 例;年龄 15~28 岁,平均年龄 (19±2) 岁;BCG 接种比率为 78.8% (331/420)。均无临床症状、X 线胸片无异常表现、问卷调查无结核病史及结核病密切接触史。本研究通过首都医科大学附属北京胸科医院伦理委员会批准并取得患者的知情同意。

### 1.2 方法

1.2.1 BCG-PPD 皮肤试验 受试者前臂皮内注射 0.1 ml BCG-PPD (成都生物制品研究所:50 IU/ml),由昌平区结核病防治所有经验医务人员操作,72 h 后由 2 位医生共同查验结果及卡痕。定义 TST 硬结平均直径 ≥10 mm 或出现水泡双圈者为阳性反应。

1.2.2 MTB 特异性蛋白抗原定量 将表达纯化的结核分枝杆菌特异性 E/C 融合蛋白 (深圳华大基因) 和 Rv3879c 蛋白<sup>[5]</sup>,经 BCA 蛋白试剂盒 (北京普利来公司) 定量后分别用 AIM-V 无血清培养基 (美国 Gibco 公司) 调整稀释终浓度均为 0.4 g/L,于 4℃ 保存备用。

1.2.3 ELISPOT 检测 肝素钠抗凝管采集 4~6 ml 静脉血标本,并用 Ficoll 淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物制品有限公司) 密度梯度法离心分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC),再用 AIM-V 调整终浓度至  $2.5 \times 10^6$  个/ml。依据 ELISpot PLUS 试剂盒 (MABTECH 公司货号:3420-4AST-4) 操作说明,于 96 孔 IFN- $\gamma$  预包被板孔中分别加入阳性对照植物血凝素 100  $\mu$ l (终浓度 10  $\mu$ g/ml);备用的 E/C 融合和 Rv3879c 蛋白各 100  $\mu$ l,阴性对照仅加 100  $\mu$ l 的 AIM-V 无血清培养基,各检测孔和对照孔均设

置复孔。每孔加入 100  $\mu$ l 上述 PBMC 悬液,5%CO<sub>2</sub> 培养 18~24 h。弃细胞悬液 1×PBST (含 0.05% 吐温-20 的 PBS) 洗涤 6 遍后,加入 100  $\mu$ l 用 PBS 稀释的生物素标记抗体 (1:100 稀释),置 37℃ 孵育 1 h;弃去液体,用 1×PBST 洗板 6 次,加入 100  $\mu$ l 用 PBS 稀释的酶结合物 (1:100 稀释),置 37℃ 孵育 30 min;弃液同上洗涤后,每孔加入平衡至室温的显色液 100  $\mu$ l,置 37℃ 避光显色 7~15 min 至斑点显示出合适大小;加入双蒸水或去离子水终止反应,将板放在 37℃ 烘箱中干燥 30 min;通过美国 CTL 公司的酶联免疫斑点系统 (CTL ImmunoSpot S5 Versa Analyzer) 计数着色的斑点。

结果判定标准:当空白对照孔内斑点数 <6 时,任一实验孔斑点数减去空白对照孔斑点数 ≥5,结果为阳性;若空白对照孔斑点数 ≥5,任一实验孔斑点数 ≥2 倍空白孔斑点数,结果为阳性;若空白对照孔内斑点数 ≥10 或阳性对照孔内斑点数 <20,试验无效。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,采用单样本的 Kolmogorov-Smirnov 检验法对分泌 IFN- $\gamma$  的 SFC 数量进行正态性检验,非正态分布的数据用中位数 (四分位间距) 表示。计量资料两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验;计数资料采用连续性校正的 Pearson  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 ELISPOT 检测 TST 阳性大学新生 LTBI 的比较 rE/C-ELISPOT 检测 LTBI 的阳性率为 40.7% (171/420) 较 Rv3879c-ELISPOT 的 39.8% (167/420) 高,但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。rE/C 联合 Rv3879c 抗原 ELISPOT 检测 LTBI 的阳性率为 41.2% (173/420)。ELISPOT 总的阳性率在 TST 直径为 10~14、15~20 和 ≥20 mm 组中分别为 37.6%、45.4% 和 64.3%,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同直径组中联合抗原 ELISPOT 的斑点形成细胞数差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

纳入的 420 例受试者中,BCG 总的接种比率为 79.8% (335/420)。当把受试者分为 BCG 接种和未接种组,ELISPOT 的阳性率分别为 41.5% 和 40.0%,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

2.2 结核感染发病情况监测 对 173 例未进行治疗的 ELISPOT+/TST+ 的大学新生进行健康教育,且每年经胸部 X 片检查,经 3 年监测活动性结核病的发生率为 0。

表 1 不同组别中酶联免疫斑点检测(ELISPOT)的斑点形成细胞和阳性率比较

组别	例数	斑点形成细胞数[ $/2.5\times10^5$ 外周血单个核细胞数, $M(P_{25}\sim P_{75})$ ]				酶联免疫斑点检测阳性率( $n, \%$ )		
		rE/C	Rv3879c	联合抗原		rE/C	Rv3879c	联合抗原
TST 直径(mm)	10~14	295	4(2~17)	4(3~16)	4(3~16)	110(37.6)	108(37.6)	111(37.6)
	15~19	97	5(3~30)	4(3~21)	5(3~21)	43(45.4)	43(45.4)	44(45.4)
	$\geq 20$	28	8(3~28)	7(3~27)	8(3~31)	18(64.3)	18(64.3)	18(64.3)
	$\chi^2$ 值					8.405	4.797	8.408
	$P$ 值					0.015	0.091	0.012
BCG 接种	有	335	5(3~26)	4(3~20)	5(3~22)	138(41.5)	136(41.5)	139(41.5)
	无	85	5(3~27)	4(3~18)	4(3~24)	33(40.0)	33(40.0)	34(40.0)
	$\chi^2$ 值					1.000	0.805	0.064
	$P$ 值					0.833	0.433	0.447

注:rE/C;ESAT-6 和 CFP-10 融合蛋白;联合抗原;rE/C 和 Rv3879c 联合蛋白抗原;斑点形成细胞为中位数(四分位间距)。

3 讨 论

结核潜伏感染(LTBI)是机体对结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)抗原刺激产生的持久性免疫反应,临床上没有任何活动性结核的征象<sup>[6]</sup>。目前 LTBI 的诊断缺乏金标准,其主要依靠的结核菌素皮肤试验(TST)结果,一般将 PPD 强阳性或短期内从阴性转为阳性,而无临床结核病证据者判断为 LTBI。此法所需费用较少,简单易行,但所应用 PPD 是从结核分枝杆菌中粗提的抗原混合物,与卡介苗(BCG)和大多数环境分枝杆菌抗原之间存在交叉反应,我国结核高流行且广泛接种 BCG,会造成特异度低;而在 HIV 感染患者、自身免疫性疾病、老人和幼儿等免疫力低下的人群中容易出现假阴性,敏感度低。目前,基于分枝杆菌基因组学及其细胞免疫研究成果 IGRAs 在检测结核感染中具有较 TST 高的诊断价值,但国际上流行的 T-SPOT.TB™(T-SPOT.TB, Oxford Immunotech, Abingdon, UK)和 QuantiFERONTBGold(QFT-G, Cellestis, Carnegie, Australia)试剂盒采用结核分枝杆菌肽段库作为抗原,价格昂贵,限制了其应用。而克隆表达蛋白能够大规模生产且价格相对便宜,利于在我国结核高感染率国家推广应用<sup>[7-9]</sup>。

本研究中应用的 rESAT-6/CFP-10 融合蛋白抗原已得到广泛肯定<sup>[9-10]</sup>,Rv3879c 蛋白在 M. bovis 感染的牛中诱发强烈的免疫反应,在结核病诊断中也被证实具有高特异性<sup>[11-12]</sup>。rE/C-ELISPOT 检测 420 例 TST

阳性大学新生中 LTBI 为 40.7%,联合 Rv3879c 抗原的 ELISPOT 总的阳性率增加至 41.2%。提示两抗原可以使机体产生高水平的 IFN- $\gamma$ ,辅加新抗原 Rv3879c 能提高 LTBI 的检测率<sup>[13]</sup>。

本研究中 ELISPOT 在 TST 直径 10~14、15~19 和  $\geq 20$  mm 组间的 SFCs 数量和阳性率均不同( $P=0.02$  和  $P=0.015$ )(表 1),且随 TST 直径增加 ELISPOT 阳性率增加。由于 IGRAs 和 TST 的敏感性与活动性结核病患者、以及可能性感染源的接触程度(持续时间和距离)具有相关性方面一致,但 IGRAs 较 TST 在结核感染诊断中具有更高的阴性预测值<sup>[14-15]</sup>。在 BCG 接种和未接种组中 ELISPOT 总的阳性率分别为 41.5% 和 40.0%,差异无统计学意义( $P=0.447$ )。提示 ELISPOT 应用结核分枝杆菌 RD1 区编码的特异性抗原不受 BCG 接种影响,较 TST 具有天然优势<sup>[7-8]</sup>。研究表明,PPD 反应强者是结核病的高发对象,也是发现病人和预防发病的重点对象,发现先用 TST 然后用 IGRAs 验证的两步法成本效益最高,而仅用 TST 者最低<sup>[16-17]</sup>。因此本研究探索了采用“两步法”检测高校入学新生结核潜伏感染的情况。

大学生是一个具有结核病流行病学特点的人群。主要为 18~20 岁青年,正处在体格发育、内分泌系统变化较大的青春后期,也处于结核感染、发病起始上升阶段<sup>[16]</sup>。本研究 TST 阳性者中 LTBI 比率为 41.2%,与我国入伍新兵 LTBI 比率(39.1%)相近<sup>[10]</sup>。2000 年第



四次全国结核病流行病学抽样调查报告显示,以 PPD 皮试 $\geq 10$  mm 为感染标准,年龄大于 15 岁的全人口结核感染率为 31.7%<sup>[2]</sup>;最新一项基于 IGRAs 的大型多中心研究结果显示我国农村 LTBI 比率为 19%<sup>[18]</sup>。LTBI 的诊断缺乏金标准,无法直接估计 IGRAs 和 TST 检测 LTBI 的敏感度和特异度差异,但本研究 TST 阳性者中仍有高达 58.8% 的 ELISPOT 为阴性,提示仅以 TST 检测大学新生 LTBI 的比率可能被高估了。

大学生结核患病率明显高于普通人群,应引起高度重视<sup>[16,19-21]</sup>。但 IGRAs 和 TST 阳性结果与活动性结核病的关联均不够强,如以筛查阳性作为预防性治疗的标准可能导致不必要的治疗和伴随而来的药物不良反应,因此我国尚未强制实施化学预防治疗方案<sup>[22-23]</sup>。考虑到大学生也是易于管理、接受能力强的群体,本研究对 173 名 ELISPOT 和 TST 双阳性者制定了一系列的措施(如加强结核病知识的宣传教育、鼓励坚持锻炼身体、每年定期体检和胸部 X 片检查等措施)3 年内尚未发现活动性结核病患者。

总之,本研究首次先用 TST,然后对 TST 阳性者进一步通过 IGRAs 证实 LTBI 的两步法调查了大学新生 LTBI 情况。提示我国结核高流行且广泛接种 BCG,仅以 TST 检测 LTBI 的比率可能被高估了。对制定高校结核病防治策略和措施提供了一些信息,具有一定的现实意义。但这项研究样本量较小、不能代表中国大学新生 LTBI 的基线情况,仍需大规模前瞻性研究。

#### 参考文献

- [1] Wang L, Liu J, Chin DP. Progress in tuberculosis control and the evolving public-health system in China[J]. Lancet, 2007, 369(9562): 691-696.
- [2] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 3-7.
- [3] National Collaborating Centre for Chronic Conditions, Centre for Clinical Practice at NICE. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control [R]. London: Royal College of Physicians, 2011.
- [4] Muñoz L, Stagg HR, Abubakar I. Diagnosis and Management of Latent Tuberculosis Infection [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015, 5(11): pii: a017830.
- [5] 陈曦, 张宗德, 刘忠泉, 等. 结核分枝杆菌 rv3873、rv3879c 基因原核表达载体的构建和表达 [C]. 中华医学会结核病学分会 2006 年学术会议论文汇编.
- [6] Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, et al. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. N Engl J Med, 2015, 372(22): 2127-2135.
- [7] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis* [J]. J Bacteriol, 1996, 178(5): 1274-1282.

- [8] Lalvani A, Pareek M. A 100 year update on diagnosis of tuberculosis infection [J]. Br Med Bull, 2010, 93: 69-84.
- [9] Hemmati M, Seghatoleslam A, Rasti M, et al. Expression and purification of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (TB) antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT-6/CFP-10 and their diagnosis potential for detection of TB patients [J]. Iran Red Crescent Med J, 2011, 13(8): 556-563.
- [10] Wu X, Li Q, Yang Y, et al. Latent tuberculosis infection amongst new recruits to the Chinese army: comparison of ELISPOT assay and tuberculin skin test [J]. Clin Chim Acta, 2009, 405(1-2): 110-113.
- [11] Cockle PJ, Gordon SV, Lalvani A, et al. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics [J]. Infect Immun, 2002, 70(12): 6996-7003.
- [12] Liu XQ, Dosanjh D, Varia H, et al. Evaluation of T-cell responses to novel RD1- and RD2-encoded *Mycobacterium tuberculosis* gene products for specific detection of human tuberculosis infection [J]. Infect Immun, 2004, 72(5): 2574-2581.
- [13] Houghton RL, Lodes MJ, Dillon DC, et al. Use of multi-epitope polypeptides in serodiagnosis of active tuberculosis [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(4): 883-891.
- [14] Song S, Jeon D, Won Kim J, et al. Performance of confirmatory interferon- $\gamma$  release assays in school TB outbreaks [J]. Chest, 2012, 141(4): 983-988.
- [15] Dagnew AF, Hussein J, Abebe M, et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection in healthy young adults in a country with high tuberculosis burden and BCG vaccination at birth [J]. BMC Res Notes, 2012, 5: 415.
- [16] 赵福郡, 高铁杰, 刘德水, 等. 北京市昌平区高校新入学学生结核菌素反应强度及患病调查 [J]. 中国防痨杂志, 2007, 29(5): 399-401.
- [17] Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Direct costs of three models for the screening of latent tuberculosis infection [J]. Eur Respir J, 2006, 28(1): 45-50.
- [18] Gao L, Lu W, Bai L, et al. Latent tuberculosis infection in rural China: baseline results of a population-based, multicentre, prospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15(3): 310-319.
- [19] Fang Y, Zhang L, Tu C, et al. Outbreak of pulmonary tuberculosis in a Chinese high school, 2009-2010 [J]. J Epidemiol, 2013, 23(4): 307-312.
- [20] 齐宝宁, 孟娟娟, 张志刚, 等. 某中医学院学生结核病知识、态度调查 [J]. 实用预防医学, 2013, 20(8): 961-962.
- [21] 董恩军, 徐力红, 张翠英, 等. 一起肺结核聚集性疫情的流行病学调查 [J]. 中国热带医学, 2014, 14(7): 866-868.
- [22] Trajman A, Steffen RE, Menzies D. Interferon- $\gamma$  release assays versus tuberculin skin testing for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an overview of the evidence [J]. Pulm Med, 2013, 2013: 601737.
- [23] 舒晋峰, 许小敏, 潘桔聪. 结核感染 T 细胞斑点试验对结核性疾病诊断价值探讨 [J]. 实用预防医学, 2013, 20(8): 358-360.