

· 论著 ·

两种 γ 干扰素释放试验及 PPD 试验结果
在结核感染诊断中的比较

梁艳 王兰 张翠英 王志耘 侯英 阳幼荣 张俊仙 赵文娟 吴雪琼

【摘要】 目的 研究 2 种 γ 干扰素 (IFN- γ) 释放试验 (interferon- γ release assays, IGRA) 和 PPD 试验在结核感染诊断中的相关性及应用价值。**方法** 对 2010 年 178 名驻京部队河南籍入伍新兵进行 PPD 试验, 用结核分枝杆菌特异性重组培养滤液蛋白 10 (culture filtrate protein 10, CFP10)-早期分泌性靶抗原 6 (early secretory antigenic target 6, ESAT6) 融合蛋白 (重组 CFP10-ESAT6 融合蛋白)-酶联免疫斑点试验 (enzyme linked-immunospot assay, ELISPOT) 检测新兵外周血释放 IFN- γ 的效应 T 淋巴细胞, 并用结核分枝杆菌 CFP10-ESAT6 重组蛋白-化学发光酶免疫法 (chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA) 检测其全血中 IFN- γ 水平。**结果** 178 名入伍新兵中, PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 的阳性率分别为 39.89% (71/178)、31.46% (56/178) 和 21.35% (38/178)。前者阳性率显著高于后二者 ($\chi^2=14.3663, P<0.01$), ELISPOT 法阳性率也显著高于 CLEIA 法 ($\chi^2=4.6834, P<0.05$)。在 107 名 PPD 试验阴性者中, ELISPOT、CLEIA 法检测阳性者分别为 33 例 (30.84%)、14 例 (13.08%), 前者阳性率显著高于后者 ($\chi^2=9.8425, P<0.01$)。在 71 例 PPD 阳性者中, ELISPOT、CLEIA 法检测阳性者分别为 23 例 (32.39%)、24 例 (33.80%), 两者差异无统计学意义 ($\chi^2=0.0318, P>0.05$)。ELISPOT 法和 PPD 试验的一致率为 54.49% (97/178, $U=0.218, P>0.05$); CLEIA 法和 PPD 试验的一致率为 65.73% (117/178, $U=3.227, P<0.01$), ELISPOT 和 CLEIA 法的一致率为 66.29% (118/178, $U=1.885, P>0.05$); PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测方法的一致率为 42.70% (76/178)。ELISPOT 法检测的斑点数与 PPD 试验反应的硬结平均直径之间缺乏相关性 ($r=0.13851, P>0.05$); CLEIA 法检测的 IFN- γ 水平与 PPD 试验反应的硬结平均直径之间有低的相关性 ($r=0.25244, P<0.01$); ELISPOT 检测的斑点数与 CLEIA 检测的 IFN- γ 水平之间也有低的相关性 ($r=0.2755, P<0.01$)。在卡介苗接种者中, PPD 试验检测的阳性率为 50.00% (48/96), ELISPOT 为 22.92% (22/96), CLEIA 为 23.96% (23/96); 在无卡介苗接种者中, PPD 试验检测的阳性率为 28.05% (23/82), ELISPOT 为 47.56% (39/82), CLEIA 为 17.07% (14/82)。**结论** 两种 IGRA 方法与 PPD 试验之间的一致性差、相关性低, 用 IGRA 方法能够有效地筛查结核感染, 而 ELISPOT 检测的阳性率高于 CLEIA。

【关键词】 潜伏性结核/诊断; 干扰素 γ 释放试验; 结核菌素试验; 酶联免疫斑点测定; 免疫酶技术

The results comparison of two methods of Interferon- γ release assays with PPD skin test in TB infection diagnosis
LIANG Yan, WANG Lan, ZHANG Cui-ying, WANG Zhi-yun, HOU Ying, YANG You-rong, ZHANG Jun-xian, ZHAO Wen-juan, WU Xue-qiong. Army Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory, Beijing Key Laboratory of New Techniques of Tuberculosis Diagnosis and Treatment, Institute of Tuberculosis Research, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: WU Xue-qiong, Email: wu-xueqiong@263.net

【Abstract】 Objective To analyze the relevance and application value of 2 kinds of interferon gamma (IFN- γ) release test (IGRA) and purified protein derivative (PPD) skin test. **Methods** A total of 178 new recruits to the army from Henan province received intradermally injected with purified protein derivative PPD skin test and to detect IFN- γ t lymphocytes in peripheral blood with enzyme linked-immunospot assay (ELISPOT) assay and IFN- γ in whole blood with chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) with recombinant CFP-10/ESAT-6 fusion protein (rCFP-10/ESAT-6) as a stimulus. **Results** The prevalence of Latent TB infection (LTBT), as estimated

by PPD skin test, ELISPOT assay and CLEIA, was 39.89% (71/178), 31.46% (56/178) and 21.35% (38/178) of new recruits, respectively. The positive rate by PPD skin test is significant higher than that by two methods of IGRA ($\chi^2 = 14.3663, P < 0.01$), the positive rate by ELISPOT is significant higher than that by CLEIA ($\chi^2 = 4.6834, P < 0.05$). Of 107 PPD-negative volunteers, 33 (30.84%) were ELISPOT-positive and 14 (13.08%) were CLEIA-positive, respectively, the positive rate by ELISPOT is higher than that by CLEIA ($\chi^2 = 9.8425, P < 0.01$). Of 71 PPD-positive volunteers, 23 (32.39%) were ELISPOT-positive and 24 (33.80%) were CLEIA-positive, respectively, there was no statistically significant difference ($\chi^2 = 0.0318, P > 0.05$). Agreement between PPD skin test and ELISPOT assay was 54.49% (97/178, $U = 0.218, P > 0.05$); agreement between PPD skin test and CLEIA was 65.73% (117/178, $U = 3.227, P < 0.01$); agreement between ELISPOT assay and CLEIA was 66.29% (118/178, $U = 1.885, P > 0.05$). Overall agreement among three tests was 42.70% (76/178). There was no correlation between spot formation cells detected by ELISPOT with average diameter detected by PPD skin test ($r = 0.13851, P > 0.05$). There are low correlation between IFN- γ level detected by CLEIA with average diameter detected by PPD skin test ($r = 0.25244, P < 0.01$); There are low correlation between spot formation cells detected by ELISPOT with IFN- γ level detected CLEIA ($r = 0.2755, P < 0.01$). 50.00% (48/96) of PPD-positive new recruits, 22.92% (22/96) of ELISPOT-positive new recruits and 23.96% (23/96) of CLEIA-positive new recruits found the BCG vaccination scars on their arms; while 28.05% (23/82) of PPD-positive new recruits, 47.56% (39/82) of ELISPOT-positive new recruits and 17.07% (14/82) of CLEIA-positive new recruits had not BCG scars. **Conclusion** There was low correlation and poor agreement between two methods of IGRA assays and PPD skin test, but IGRA may be more accurate methods for screening TB infection in countries with high coverage of BCG vaccination, the sensitivity of ELISPOT is higher than that of CLEIA.

【Key words】 Latent tuberculosis/diagnosis; Interferon-gamma release tests; Tuberculin test; Enzyme-linked immunospot assay; Immunoenzyme techniques

结核病是慢性呼吸道传染病,目前我国约有 5.5 亿人感染了结核分枝杆菌^[1]。结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)皮肤试验是结核病辅助诊断的一种重要方法,但由于纯蛋白衍生物是多种抗原的混合物,所含抗原为致病性结核分枝杆菌、环境分枝杆菌及卡介苗(BCG)菌株所共有,其结果受到 BCG 接种及其他环境分枝杆菌感染的影响,诊断特异度低;由于我国约 76% 的新生儿接种了 BCG^[1],而 PPD 试验不能区分是结核感染还是 BCG 接种^[2-3]。因此,目前结核潜伏感染的诊断缺乏“金标准”。笔者以结核分枝杆菌特异性重组培养滤液蛋白 10 (culture filtrate protein 10, CFP10)-早期分泌性靶抗原 6 (early secretory antigenic target 6, ESAT6)融合蛋白(重组 CFP10-ESAT6 融合蛋白)为刺激剂,建立了 2 种新的、结核特异的 γ 干扰素 (IFN- γ) 释放试验(interferon- γ release assays, IGRA):一种是酶联免疫斑点试验(enzyme linked-immunospot assay, ELISPOT),该方法能够检测外周血单个核细胞中分泌结核特异的 IFN- γ 的效应 T 淋巴细胞的斑点数^[4-6];另一种是全血 IFN- γ 释放试验,用化学发光酶免疫法(chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)检测血浆中分泌的结核特异的 IFN- γ 水平。部队军事人员集中居住、训练,生活、工作中接触密切,入伍新兵来自全国各地,结核感染情况不同;因此,军事人员是结核感染的高危人群^[7]。笔者研究 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 3 种检测方法

在诊断结核感染时的相关性及应用价值,为驻京部队入伍新兵中结核潜伏感染者筛查方法的选择提供实验依据,为发现高危人群,以及制定军队结核病预防、控制策略奠定基础。

对象和方法

一、研究对象

178 名 2010 年驻京部队河南籍入伍新兵,均为男性,年龄 17~24 岁,平均年龄(19.2 $\pm$ 1.7)岁,常规胸部 X 线检查均为阴性。本研究经解放军第三〇九医院伦理委员会审核并通过,同时征得受试对象同意。

二、研究方法

1. 标本采集:采集驻京部队河南籍入伍新兵静脉血 2 管,每管 4 ml,均用肝素钠抗凝,一管用于 ELISPOT 检测,一管用于全血 IFN- γ 释放试验。

2. PPD 试验:采集静脉血后,进行 PPD 试验。具体方法如下:吸取卡介苗 PPD (50 IU/ml) 0.1 ml (5 IU),采用 Mantoux 法注射于前臂掌侧皮内。于注射后 72 h 检查注射部位反应,若硬结平均直径 ≥ 5 mm 为阳性,5~9 mm 为一般阳性(+),10~19 mm 为中度阳性(++), ≥ 20 mm 为强阳性(+++) (硬结平均直径 < 20 mm,局部发生水疱或坏死也为强阳性)^[8]。参加研究人员为经过专业培训的全军结核病防治队人员,负责查验双上臂有否 BCG 接种瘢痕;PPD 试验后检查、测量 PPD 反应情况及硬结

平均直径。

3. ELISPOT 方法:采用上海铭源数康生物芯片有限公司的结核感染 T 细胞检测试剂盒(F-SPOT, TB),按说明书操作。简述如下:(1)外周血单个核细胞分离及计数:取 4~5 ml 外周血(抗凝),用淋巴细胞分层液分离、提取单个核细胞(PBMCs),调节细胞浓度至 $2 \times 10^6/L$ 。(2)分泌 IFN- γ 的 T 细胞检测:每个测试样本需要微孔板 3 孔:在阴性对照孔内加入完全细胞培养液 50 μ l;在阳性对照孔内加入阳性对照植物凝集素(phytohemagglutinin, PHA)50 μ l;在 2 个测试孔内分别加入重组 CFP10-ESAT6 融合蛋白 50 μ l。分别在上述各孔内,加 100 μ l 含有 2×10^5 个 PBMCs 的悬液,将微孔板置于 37 $^{\circ}C$ 、含 5% CO_2 的孵箱中孵育 20 h;弃培养上清,加入 200 μ l 于 4 $^{\circ}C$ 下预冷的无菌蒸馏水裂解细胞 10 min,用 200 μ l 1 $\times$ PBST[磷酸盐缓冲液(PBS)-Tween20(PBST)]洗板 3 次,1 min/次,最后 1 次洗板后拍干;在每个孔中加入 100 μ l 用 PBS 稀释的生物素标记抗体(1:200 稀释),于 37 $^{\circ}C$ 下孵育 1 h;洗板后,加入 100 μ l 用 PBS 稀释的链亲合素-碱性磷酸酶(1:200 稀释),于 37 $^{\circ}C$ 下孵育 30 min;洗板后,每孔加入显色液 100 μ l,于 37 $^{\circ}C$ 下闭光显色 7~15 min;可见板底显示紫蓝色斑点,在 96 孔聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜板中加入双蒸水或去离子水终止反应,将板放入 37 $^{\circ}C$ 烘箱中干燥 30 min。使用酶联斑点分析仪或放大镜计数着色的斑点,每一个点代表一个分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞。当阳性对照孔斑点数 ≥ 20 个,阴性对照孔斑点数 < 13 个,检测孔斑点数减去阴性对照孔斑点数 ≥ 16 个,可判断所检测标本为阳性;阳性对照孔斑点数 ≥ 20 个,当阴性对照孔斑点数 ≥ 13 个、 ≤ 20 个,检测孔斑点数为阴性对照孔斑点数的 2 倍,可判断所检测标本为阳性。

4. 全血 IFN- γ 释放试验(CLEIA):直接将肝素

抗凝的全血与阳性对照 PHA、CFP10-ESAT6 融合蛋白,以及阴性对照完全细胞培养液共同孵育 18~20 h;如果受试者感染过结核分枝杆菌,其外周血会有特异效应 T 淋巴细胞,在体外再次受到抗原刺激时会释放分泌 IFN- γ 并弥散至血浆中;用 CLEIA 的方法检测血浆中 IFN- γ 的水平来达到诊断的目的。根据前期研究,检测孔 IFN- γ 的水平减去阴性对照孔 IFN- γ 的水平 ≥ 396.5 pg/ml,可判断所检测标本为阳性^[9]。

5. 统计学分析:应用 SAS 6.12 软件处理数据,定性资料的差异性分析用 $R \times C$ 表假设检验,两组定性资料的一致性检验用 $Kappa$ 检验;正态分布的定量资料的差异性分析用单因素方差分析,两两比较用 Dunnett t 检验,偏态分布的定量资料用秩和(Kruskal-Wallis)检验,两两比较用 q 检验;两组定量资料的相关分析用 Pearson 线性相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、入伍新兵 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果

178 名驻京部队河南籍入伍新兵的 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果见表 1。其中 PPD 试验阳性者 71 例(39.89%, 71/178)、强阳性者 4 例(2.25%),ELISPOT 阳性者 56 例(31.46%),CLEIA 阳性者 38 例(21.35%),PPD 试验阳性率显著高于 2 种 IGRA 试验($\chi^2 = 14.3663, P = 0.0008$),ELISPOT 阳性率也显著高于 CLEIA 法($\chi^2 = 4.6834, P < 0.05$)。在 107 名 PPD 阴性者中,33 例(30.84%, 33/107)为 ELISPOT 阳性,14 例(13.08%, 14/107)为 CLEIA 阳性,ELISPOT 阳性率显著高于 CLEIA 阳性率($\chi^2 = 9.8425, P < 0.01$);在 71 例 PPD 阳性者中,23 例(32.39%, 23/71)为 ELISPOT 阳性,24 例(33.80%, 24/71)为 CLEIA 阳性,两者差异无统

表 1 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果

PPD 试验			ELISPOT 检测		CLEIA 检测	
结果	例(名)	硬结平均直径(mm)	阳性例数 [阳性率(%)]	斑点(个)中位数 (最小值,最大值)	阳性例数 [阳性率(%)]	IFN- γ (pg/ml)中位数 (最小值,最大值)
阴性	107	< 5	33(30.84) ^a	7(0,94)	14(13.08)	148.26(0.00,64.65)
阳性	71	≥ 5	23(32.39)	7(0,181)	24(33.80) ^c	198.88(0.00,820.90)
合计	178		56(31.46) ^b	7(0,181)	38(21.35)	154.35(0.00,864.65)

注 a:与 CLEIA 法比较, $\chi^2 = 9.8425, P < 0.01$; b:与 CLEIA 法比较, $\chi^2 = 4.6834, P < 0.05$; c:与 PPD 试验阴性组比较, $\chi^2 = 11.2931, P < 0.01$

计学意义($\chi^2=0.0318, P>0.05$)。

二、入伍新兵 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果的两两比较

71 例 PPD 试验阳性者,ELISPOT 检测阳性 23 例(32.39%)、阴性 48 名;107 名 PPD 试验阴性者,ELISPOT 检测阳性 33 例(30.84%)、阴性 74 例;两者的一致率为 54.49%(97/178),两种检测结果一致性分析显示,ELISPOT 与 PPD 试验之间缺乏一致性($U=0.218, P>0.05; Kappa=0.0161$),结果见表 2。两种检测结果相关性分析显示 ELISPOT 斑点数与 PPD 试验硬结平均直径之间缺乏相关性($r=0.13851, P>0.05$),其散点图见图 1。

表 2 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 PPD 试验和 ELISPOT 检测结果比较(例或名)

PPD 试验	ELISPOT 检测		
	阳性	阴性	合计
阳性	23	48	71
阴性	33	74	107
合计	56	122	178

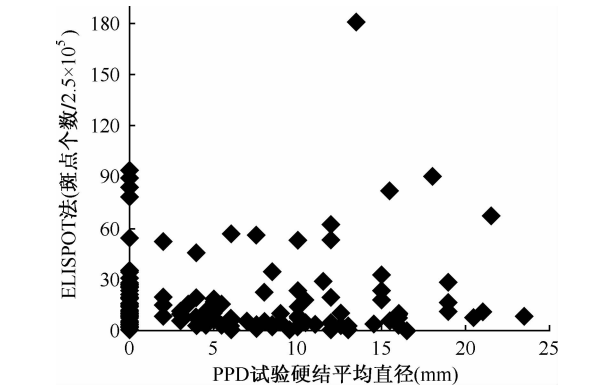


图 1 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 ELISPOT 法和 PPD 试验检测结果的关系

71 例 PPD 试验阳性者,CLEIA 检测阳性与阴性者分别为 24 例(33.80%)、47 名(66.20%);107 名 PPD 试验阴性者,CLEIA 检测阳性与阴性者分别为 14 例(13.08%)、93 名(86.92%),两者的一致率为 65.73%(117/178)。两种检测结果一致性分析显示,CLEIA 与 PPD 试验之间的一致性差异具有统计学意义($U=3.227, P<0.01; Kappa=0.2248$),结果见表 3。两种检测结果相关性分析显示,CLEIA 检测的 IFN- γ 水平与 PPD 试验硬结平均直径之间有相关性($r=0.25244, P<0.01$),其散点图见图 2。

表 3 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 PPD 试验和 CLEIA 法检测结果比较(例或名)

PPD 试验	CLEIA 检测		
	阳性	阴性	合计
阳性	24	47	71
阴性	14	93	107
合计	38	140	178

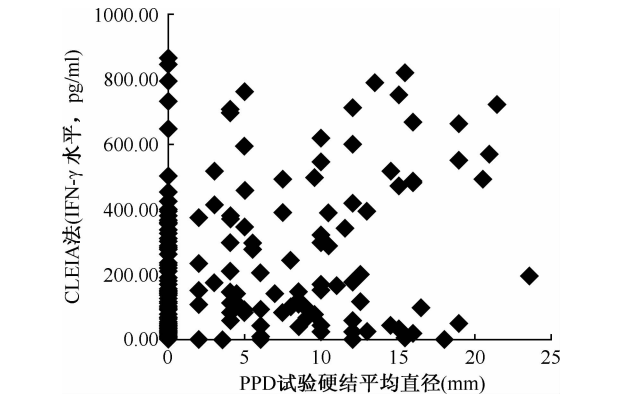


图 2 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 CLEIA 法和 PPD 试验检测结果的关系

56 例 ELISPOT 检测阳性者,CLEIA 检测 17 例(30.36%)为阳性,39 名为阴性;在 122 名 ELISPOT 阴性者中,CLEIA 检测 21 例(17.21%)为阳性,101 名为阴性;两者的一致率为 66.29%(118/178)。两种检测结果一致性分析显示,ELISPOT 与 CLEIA、PPD 试验之间缺乏一致性($U=1.885, P>0.05; Kappa=0.1440$),结果见表 4。两种检测结果相关性分析显示 ELISPOT 斑点数与 CLEIA 检测的 IFN- γ 水平相关($r=0.2755, P<0.01$),其散点图见图 3。

表 4 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 ELISPOT 和 CLEIA 检测结果比较(例或名)

ELISPOT 检测	CLEIA 检测		
	阳性	阴性	合计
阳性	17	39	56
阴性	21	101	122
合计	38	140	178

三、入伍新兵 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果的比较

PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 法检测同时阳性者有 11 例,同时阴性者有 65 名;3 种方法中 2 种

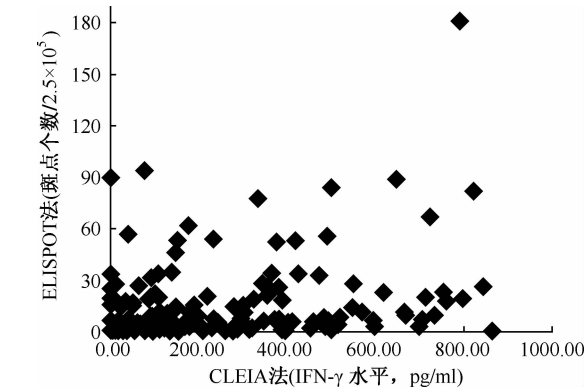


图 3 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 ELISPOT 和 CLEIA 检测结果的关系

均阳性者有 41 例;1 种方法为阳性者共有 72 例,其中 PPD 单阳 35 例,ELISPOT 单阳 28 例,CLEIA 单阳 9 例;2 种 IGRA 方法联合检测的阳性率为 43.82%(78/178),在 107 名 PPD 阴性者中和 71 例 PPD 阳性者中 2 种 IGRA 方法联合检测的阳性率分别为 39.25%(42/107)和 50.70%(36/71)。3 种检测方法的一致率为 42.70%(76/178),三者的检测结果差异具有统计学意义($\chi^2=14.3663, P<0.01$),结果见表 5。

四、BCG 接种对入伍新兵 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果的影响

根据手臂上是否有卡痕来判断是否接种了 BCG。178 名驻京部队河南籍入伍新兵中有卡痕者 96 名(53.93%),其中 48 例(50.00%)为 PPD 试验阳性,22 例(22.92%)ELISPOT 检测阳性,23 例(23.96%)CLEIA 检测阳性,PPD 试验阳性率显著高于 2 种 IGRA 法($\chi^2=20.6769, P<0.01$),但 2 种 IGRA 检测阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.029, P>0.05$)。82 名(46.07%)无卡痕,其中 23 例(28.05%)PPD 试验阳性,39 例(47.56%)ELISPOT

表 5 2010 年 178 名河南籍入伍新兵 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果比较

检测结果 编号	受检者(名) [构成比(%)]	PPD 试验	ELISPOT 检测	CLEIA 检测
1	1(0.56)	+++	+	+
2	10(5.62)	+~++	+	+
3	12(6.74)	+~++	+	-
4	2(1.12)	+++	-	+
5	11(5.62)	+~++	-	+
6	1(0.56)	+++	-	-
7	34(19.10)	+~++	-	-
8	5(2.81)	-	+	+
9	28(15.73)	-	+	-
10	9(5.06)	-	-	+
11	65(36.52)	-	-	-
合计	178(100.00)			

注 检验结果编号是指 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 3 种检测结果的不同组合;“-”代表阴性,“+”代表一般阳性,“++”代表中度阳性,“+++”代表强阳性

检测阳性,14 例(17.07%)CLEIA 检测阳性;ELISPOT 检测的阳性率显著高于 CLEIA 检测和 PPD 试验($\chi^2=18.3167, P<0.01$),但 CLEIA 与 PPD 试验检测的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=2.827, P>0.05$),结果见表 6。

讨 论

近年来,通过检测结核分枝杆菌抗原特异性 IFN- γ 水平来诊断结核感染已经被越来越多的国家所接受,与 PPD 试验比较,该技术最大的优势在于能区分结核分枝杆菌感染和 BCG 接种引起的免疫应答,而显著提高了检测的特异度,这对于 BCG 广泛接种的国家和地区意义尤其重大。

表 6 BCG 接种对 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果的影响

BCG 接种 情况	受检者 (名)	PPD 试验		ELISPOT 检测	CLEIA 检测
		阳性例数 [率(%)]	强阳性例数 [率(%)]	阳性例数 [率(%)]	阳性例数 [率(%)]
有 BCG 接种	48	0(0.00)	0(0.00)	11(22.92)	8(16.67)
	48	48(100.00)	2(4.17)	11(22.92)	15(31.25)
合计	96	48(50.00)	2(2.08)	22(22.92)	23(23.96)
无 BCG 接种	59	0(0.00)	0(0.00)	26(44.07)	5(8.47)
	23	23(100.00)	2(8.70)	13(56.52)	9(39.13)
合计	82	23(28.05)	2(2.44)	39(47.56)	14(17.07)

一、PPD 试验和 2 种 IGRA 方法的检测结果分析

本研究入伍新兵均是健康人群,实际包括了三类人员:正常人、BCG 接种者和结核潜伏感染者,其 PPD 试验阳性率为 39.89%,低于 2003—2006 年与 2006—2009 年驻京部队入伍新兵的 PPD 试验阳性率(分别为 49.9%、53.1%)^[10-11];但本研究 ELISPOT 检测的阳性率为 31.46%,与笔者 2009 年应用 ELISPOT 检测的驻京部队入伍新兵结核潜伏感染率相似(30.7%)^[6];应用全血 CLEIA 法检测的阳性率(21.35%)显著低于 PPD 试验和 ELISPOT 法,分析其可能原因如下:(1)用做抗原刺激剂的 CFP10 和 ESAT6 主要存在于结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌的基因组中,但在 BCG 和大多数环境结核分枝杆菌基因组中缺失 RD1 区,因此 2 种 IGRA 检测不受 BCG 接种的影响^[12-14],其阳性率均显著低于 PPD 试验。(2)PPD 反应是通过激活中心记忆性 T 淋巴细胞反应,它检测的主要是以前的、休眠的结核分枝杆菌感染,它的反应性比特异性 IFN- γ 反应持续的时间更长,可能也是导致应用 PPD 试验检测结核潜伏感染人群阳性率较高的原因之一^[15]。(3)特异性 IFN- γ 应答是依赖于抗原介导的效应 T 淋巴细胞的存在,检测的是近期感染或“活动性”感染,IFN- γ 的释放会随着结核分枝杆菌感染后时间的推移而逐渐地减弱,因此,2 种 IGRA 法检测结核潜伏感染人群的阳性率较低^[16]。(4)由于检测人群中包括 BCG 接种者,而本研究 PPD 试验所采用的是卡介菌 PPD,因此,PPD 试验阳性率显著高于 IGRA 法的阳性率。(5)ELISPOT 法检测的阳性率显著高于 CLEIA 法,从方法学上来说,其原因可能在于 ELIPOT 技术是从单细胞水平进行检测,可及时捕获细胞周围分泌的细胞因子,从 25 万个 PBMCs 中检出每个分泌 IFN- γ 的细胞,敏感度更高^[17]。此外,ELISPOT 法重点检测活细胞的功能,即检测单个细胞分泌 IFN- γ 的能力及分泌 IFN- γ 的细胞频率;而 CLEIA 法是在群体细胞水平检测 IFN- γ 的分泌情况,重点检测 IFN- γ 的生成量,因此,结核潜伏感染者中虽然分泌 IFN- γ 的细胞数量较多,但分泌 IFN- γ 的水平较低。

二、PPD 试验结果对 ELISPOT 和 CLEIA 检测的影响

PPD 试验阴性和阳性的新兵中 ELISPOT 检测的阳性率分别为 30.84%和 32.39%,这与笔者课题组 2009 年的报道相似:在 452 例 PPD 试验阴性和 455 例阳性者的驻京部队入伍新兵中,分别有 132

例(29.2%)和 146 例(32.1%)ELISPOT 检测阳性^[6]。2 次研究结果表明,PPD 试验阴性和阳性者 ELISPOT 检测的阳性率和斑点数差异均无统计学意义,再次证明 ELISPOT 检测结果不受 PPD 试验结果的影响。但 PPD 试验阳性的新兵中 CLEIA 检测阳性率显著高于 PPD 试验阴性的新兵,这与笔者课题组 2011 年的报道一致^[9],2 次研究结果均表明,CLEIA 检测阳性率受 PPD 试验结果的影响,这是因为 PPD 试验阳性人群中包括结核潜伏感染者,其分泌 IFN- γ 的水平高于 PPD 试验阴性人群。

三、PPD 试验与 2 种 IGRA 检测结果的相关性

目前有许多研究显示 PPD 试验与 IGRA 结果之间的一致性差、相关性低^[18-19],这与本研究结果是一致的。这 3 种方法检测机体免疫应答的原理不同,ELISPOT 检测的是体外的致敏 T 淋巴细胞再次受到结核分枝杆菌特异性抗原刺激后释放 IFN- γ 的效应 T 淋巴细胞数;CLEIA 检测的是体外的致敏 T 淋巴细胞再次受到结核分枝杆菌特异性抗原刺激后分泌 IFN- γ 的水平;而 PPD 试验的原理是迟发型变态反应,当体内致敏 T 淋巴细胞再次受到结核分枝杆菌特异蛋白刺激时会释放多种可溶性淋巴因子,导致血管通透性增加,巨噬细胞在局部集聚、浸润,在注射部位出现红肿、硬结等变态反应,其检测的是 72 h 局部出现红肿、硬结反应的平均直径。本研究 ELISPOT 与 PPD 试验检测结果缺乏一致性,其效应 T 细胞斑点数与 PPD 试验硬结平均直径之间也缺乏相关性,其原因在于虽然体外的致敏 T 淋巴细胞再次受到结核特异性抗原刺激后释放 IFN- γ 的 T 细胞数增加了,但是并不意味着其促使巨噬细胞集聚、浸润的反应程度也能成比例的增强,一部分结核潜伏感染者巨噬细胞可能对 IFN- γ 反应低或不反应,而出现 PPD 试验假阴性;此外,BCG 接种者会导致 PPD 试验假阳性。CLEIA 检测与 PPD 试验之间的一致性虽然具有一定的统计学意义,但 *Kappa* 值较小,一致率并不太高;CLEIA 检测的 IFN- γ 水平与 PPD 试验反应的硬结平均直径之间的相关性也较低,其原因同上所述。

四、对 2 种 IGRA 检测结果一致性的分析

本研究 2 种 IGRA 结果的一致性差,ELISPOT 斑点数与 CLEIA 检测的 IFN- γ 水平的相关系数较小,二者的相关性也较低。两者的差异主要是发生在 PPD 阴性的人群中,分析其可能原因如下:(1)由于 PPD 试验的敏感度低,导致部分结核潜伏感染者出现假阴性;而 ELIPOT 检测的是外周血单个核细

胞在结核特异性抗原刺激下释放 IFN- γ 的效应 T 细胞数量,因为其单个核细胞是定量的,所以排除了个体之间 T 细胞数量不同的影响,检测的敏感度较高^[20-21];CLEIA 检测的是全血中致敏 T 细胞再次受到结核特异性抗原刺激后释放的 IFN- γ 水平,其单个核细胞是不定量的,且不同人的单个核细胞数也不同,其结果可能受到个体 T 细胞数量不同的影响,一部分 T 细胞数量较低或释放 IFN- γ 较少的个体也可能出现假阴性,使 CLEIA 检测的敏感度高于 PPD 试验、低于 ELISPOT;(2)潜伏感染人群中 PPD 阴性者可能是由于其体内致敏 T 淋巴细胞再次受到结核分枝杆菌特异蛋白刺激后释放的细胞因子水平较低,不能引起血管通透性增加,也不能诱使巨噬细胞在局部集聚、浸润;但 ELISPOT 方法可捕捉到释放 IFN- γ 的效应 T 细胞,敏感度较高;而部分释放低水平 IFN- γ 的潜伏感染者 CLEIA 检测可能出现假阴性,这就导致了 ELISPOT 与 CLEIA 的检测结果不完全一致。

五、BCG 接种对 PPD 试验、ELISPOT 和 CLEIA 检测结果的影响

我国新生儿第一针免疫接种的就是 BCG,本研究表明显示这批新兵的 BCG 接种率是 53.93%。BCG 接种人群 PPD 阳性率显著高于 2 种 IGRA 试验,而 2 种 IGRA 试验的阳性率则相近。这可能是由于 PPD 含有结核分枝杆菌和 BCG 的共同抗原,而导致 PPD 试验出现假阳性。由于做抗原刺激剂的 CFP10 和 ESAT6 基因主要存在于结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌基因组中,在 BCG 和大多数环境结核分枝杆菌基因组中 RD1 区缺失,因此 2 种 IGRA 试验具有较高的特异度,不受 BCG 接种的影响^[6,9]。

本研究无 BCG 接种人群 ELISPOT 试验的阳性率均显著高于 PPD 试验和 CLEIA 方法,一方面说明 ELISPOT 对自然感染的检出率高于 PPD 试验和 CLEIA,但也不排除假阳性的可能;另一方面说明 PPD 和 CLEIA 的敏感度不够,可能存在假阴性的问题。BCG 接种人群 PPD 阳性率显著高于无 BCG 接种人群,说明部分人出生时接种的 BCG 仍有免疫原性;BCG 接种人群 ELISPOT 的阳性率显著低于无 BCG 接种人群,而 CLEIA 在有或无 BCG 接种人群中的阳性率差异无统计学意义,均说明 BCG 接种对这两种 IGRAs 没有影响。

六、关于 2 种 IGRA 方法联合检测结果的分析
两种 IGRA 方法联合检测的阳性率为 43.82%,

略高于单独 PPD 试验的阳性率 39.89%。其原因一方面是由于 PPD 试验的敏感度不够,目前 PPD 试验的敏感度只有 70%~80%^[22],存在假阴性;另一方面说明 IGRA 检测结果可能存在假阳性问题。

PPD 试验检测 2010 年河南籍驻京部队入伍新兵结核潜伏感染的强阳性率为 2.25%,比 2003 年至 2006 年驻京部队入伍新兵的 PPD 试验强阳性率 (2.9%)略有降低^[10]。

总之,2 种 IGRA 方法与 PPD 试验之间一致性差、相关性低。但 IGRA 方法不受卡介苗接种的影响,因此用 IGRA 方法能够有效地筛查结核感染,而 ELISPOT 检测的阳性率高于 CLEIA。

参 考 文 献

- [1] 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. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25 (1):3-7.
- [2] Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis, 1993, 17(6):968-975.
- [3] Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(11): 1192-1204.
- [4] Porsa E, Cheng L, Graviss EA. Comparison of an ESAT-6/CFP-10 peptide-based enzyme-linked immunospot assay to a tuberculin skin test for screening of a population at moderate risk of contracting tuberculosis. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(6):714-719.
- [5] Hill PC, Jackson-Sillah D, Fox A, et al. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. J Clin Microbiol, 2005, 43 (5): 2070-2074.
- [6] 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. Clin Chim Acta, 2009, 405(1/2):110-113.
- [7] DiStasio AJ 2nd, Trump DH. The investigation of a tuberculosis outbreak in the closed environment of a U. S. Navy ship, 1987. Mil Med, 1990, 155(8): 347-351.
- [8] 成诗明, 王国治, 王黎霞, 等. 结核菌素皮肤试验使用指导手册. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 27-35.
- [9] Wu X, Hou Y, Liang Y, et al. Evaluation of a tuberculosis whole-blood interferon- γ chemiluminescent immunoassay among Chinese military recruits. Mol Diagn Ther, 2011, 15 (6):341-346.
- [10] 张翠英, 董恩军, 朱琳, 等. 驻京部队 2003—2006 年新兵结核感染情况调查. 解放军预防医学杂志, 2007, 25(3):188-189.
- [11] 董恩军, 张翠英, 张敬娟, 等. 某部 2006—2009 年新兵结核感染状况调查. 武警医学院学报, 2010, 19(10):786-788.
- [12] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence for occurrence of the ESAT6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun, 1996, 64(1):16-22.
- [13] 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.

- [14] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection; an update. *Ann Intern Med*, 2008, 149(3):177-184.
- [15] 王兰, 梁艳, 吴雪琼, 等. 2009 年驻京部队入伍新兵结核感染及随访情况分析. *解放军医学杂志*, 2012, 37(8):827-832.
- [16] Mori T, Harada N, Higuchi K, et al. Waning of the specific interferon-gamma response after years of tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(9):1021-1025.
- [17] 中华医学会结核病学分会,《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会. γ -干扰素释放试验在中国应用的建议. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(10):744-747.
- [18] Carvalho AC, Pezzoli MC, El-Hamad I, et al. QuantiFERON-TB Gold test in the identification of latent tuberculosis infection in immigrants. *J Infect*, 2007, 55(2):164-168.
- [19] Kim CH, Kim JY, Hwang YI, et al. Interferon- γ Enzyme-Linked Immunospot Assay in Patients with Tuberculosis and Healthy Adults. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2014, 76(1):23-29.
- [20] 万荣, 李明武, 赖明红, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在老年肺结核中的诊断价值. *中国防痨杂志*, 2015, 37(4):348-352.
- [21] 王立红, 付秀华, 张桂芝, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核病诊断中的应用价值. *中国防痨杂志*, 2013, 35(12):992-996.
- [22] Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(2):704-706.

(收稿日期:2015-03-05)

(本文编辑:薛爱华)

“第二届抗结核病药物不良反应诊治新进展研讨会”征文通知

由《中国防痨杂志》和《结核病与肺部健康杂志》编委会主办,安徽省胸科医院、安徽省防痨协会协办的国家级继续教育项目“第二届抗结核病药物不良反应诊治新进展研讨会”拟定于 2015 年在安徽省召开(具体时间和地点待定);本届会议将邀请国内著名结核病基础研究专家、临床检验专家、临床诊治专家及预防控制专家针对抗结核病药物不良反应基础研究新进展、诊断、预防和治疗的新技术、新方法、新经验和新药等进行专题学术讲座、书面交流,并共同研讨大家在工作中遇到的新情况、新问题。现征集有关论文。

一、征文内容

抗结核病药物不良反应的流行病学、基础研究新进展;临床诊治和预防的新技术、新方法和新经验;预防和治疗药物的研发(尤其是中医药在药物不良反应中的应用及效果评价研究);检测技术和试剂的临床应用及其评价标准。符合上述内容的相关论著、专家论坛、综述、学术争鸣等均可投稿。

二、征文要求

1. 投稿形式为全文+800 字左右的摘要,摘要包括目的、方法、结果和结论 4 个方面,也可仅提供符合上述要求的摘要。

2. 具体要求:(1)未在国内外公开发行人刊物上发表的论文(请在文题上方注明未公开发表,未一稿多投);(2)全文 4000 字以内,编排顺序为:题目、单位、邮编、姓名、中文摘

要、正文、参考文献;(3)本次会议征文不接收通过邮局邮寄的纸质版论文,请提供 Word 格式文件;题目 3 号黑体、正文 5 号宋体,单倍行距;(4)征文请通过 Email 发送至编辑部邮箱:zgflxhzw@163.com,邮件主题注明“药物不良反应会议征文”; (5)请务必附第一作者与通信作者的通信地址、联系电话(单位、住宅)、手机、Email,以便及时联系。联系地址:北京市西城区东光胡同 5 号(邮编:100035)。联系人:王然,手机:13811981490;电话(传真):010-62257587。

3. 入选论文将纳入会议《论文汇编》,优秀论文将由大会学术委员会推荐刊登于《中国防痨杂志》或《结核病与肺部健康杂志》。

4. 征文截稿日期:2015 年 6 月 10 日(以 Email 发送日期为准)。

三、其他

会议欢迎不准备投稿征文但是希望与会了解抗结核病药物不良反应防治新进展的专家积极报名参加会议,报名联系人杨颖编辑,邮箱:zgflxhzw@163.com。会议盖章的纸质版正式通知将在会前 1 个月寄给征文投稿及报名参加会议的专家。参加会议者均可获得国家级医学继续教育学分证书。

中国防痨协会《中国防痨杂志》编委会
中国防痨协会《结核病与肺部健康杂志》编委会