

· 论 著 ·

γ 干扰素释放试验在肺结核和非结核分枝杆菌肺病鉴别诊断中的应用价值

林玲 刘厚明 邓群益 张洁云 张明霞 朱秀云 张国良 邓国防 岳建荣 陈心春 谢虹

【摘要】 目的 探讨结核分枝杆菌特异性 γ 干扰素释放试验(interferon gamma release assays, IGRAs)在鉴别诊断肺结核和非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)肺病中的应用价值。**方法** 选择深圳市第三人民医院 2011 年 1 月至 2013 年 5 月 334 例收住于肺科住院部感染了分枝杆菌的肺病患者。采用反向斑点杂交技术对 334 例分枝杆菌感染的肺病患者痰培养分离的分枝杆菌进行菌种鉴定;采用 IGRAs 测定患者外周血结核分枝杆菌抗原特异性 γ 干扰素(IFN- γ)应答;采用结核分枝杆菌特异性荧光定量 PCR 技术检测痰标本中结核分枝杆菌 DNA。**结果** 在 334 例分枝杆菌感染的患者中,240 例的菌株为结核分枝杆菌,94 例为 NTM;240 例肺结核患者中痰结核分枝杆菌 DNA PCR 检测阳性率为 74.58%(179/240),IGRAs 检测阳性率为 77.08%(185/240);94 例 NTM 肺病患者中,结核分枝杆菌 DNA PCR 检测阳性率为 10.64%(10/94),IGRAs 检测阳性率为 20.21%(19/94)。结核分枝杆菌 DNA PCR 和 IGRAs 检测鉴别诊断肺结核和 NTM 肺病的敏感度分别为 74.58%(179/240)、77.08%(185/240),特异度分别为 89.36%(84/94)、79.79%(75/94);两种方法联合检测肺结核的敏感度为 93.75%(225/240)、特异度为 77.66%(73/94)。**结论** IGRAs 对于鉴别肺结核和 NTM 肺病具有较好的应用价值,联合应用结核分枝杆菌 DNA PCR 和 IGRAs 可以显著增加鉴别诊断的准确性,对于早期抗结核药物的选择具有重要的指导意义。

【关键词】 结核,肺/诊断; 分枝杆菌感染,非结核; γ 干扰素释放试验; 诊断,鉴别

The value of interferon-gamma release assays for the differential diagnosis between pulmonary tuberculosis and lung disease of non-tuberculosis mycobacteria (NTM) LIN Ling, LIU Hou-ming, DENG Qun-yi, ZHANG Jie-yun, ZHANG Ming-xia, ZHU Xiu-yun, ZHANG Guo-liang, DENG Guo-fang, YUE Jian-rong, CHEN Xin-chun, XIE Hong. Department of Nursing, Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China
Corresponding author: XIE Hong, Email: 185748753@qq.com

【Abstract】 Objective To evaluate the value of interferon gamma release assays for the differential diagnosis between pulmonary tuberculosis and lung disease of non-tuberculosis mycobacteria (NTM). **Methods** We chose 334 cases of pulmonary disease admitted in the Third People's Hospital of Shenzhen during the period from February 2011 to May 2013. Three hundred and thirty-four sputum specimens from these patients were identified by PCR-reverse dot blot hybridization assay. An in-house ELISPOT assay was used to determine *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific IFN- γ production in patients; PCR-fluorescent probe was used to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in sputum specimens (fluorescent quantitative PCR). **Results** Of 334 cases, 240 cases were identified as *Mycobacterium tuberculosis* infection and 94 were identified as non-tuberculosis mycobacteria infection. The positive rate of fluorescent quantitative PCR and IGRAs were 74.58%(179/240) and 77.08%(185/240), respectively in patients with PTB, while 10.64%(10/94) and 20.21%(19/94), respectively in patients with lung disease of non-tuberculosis mycobacteria. The sensitivity of the fluorescent quantitative PCR and IGRAs were 74.58%(179/240) and 77.08%(185/240), respectively; while the specificity of the two methods were 89.36%(84/94) and 79.79%(75/94), respectively. The sensitivity and specificity of two methods combined were 93.75%(225/240) and 77.66%(73/94), respectively. **Conclusion** IGRAs can detect rapidly and differentiate pulmonary tuberculosis from lung disease of non-tuberculosis mycobacteria, and the accuracy of differential diagnosis can be improved significantly

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.06.014

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2013ZX10003004-002-006);国家自然科学基金(81241065);广东省自然科学基金(S2012010008598)

作者单位:233003 蚌埠医学院护理系[林玲(研究生)、谢虹];深圳市第三人民医院肝病研究所(刘厚明、邓群益、张洁云、张明霞、朱秀云、张国良、邓国防、岳建荣、陈心春)

通信作者:谢虹,Email:185748753@qq.com

when IGRAs combined with PCR, which is important to select antituberculosis drugs for patients.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary/diagnosis; Mycobacterium infections, nontuberculous; Interferon-gamma release tests; Diagnosis, differential

非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)是指除结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌等结核分枝杆菌复合群及麻风分枝杆菌以外的分枝杆菌总称^[1]。非结核分枝杆菌病是指感染了 NTM,并引起相应器官或组织病变的疾病。近年来,NTM 发病报道呈日益增多的趋势^[2],由于非结核分枝杆菌肺病(NTM 肺病)与肺结核的临床症状和 X 线胸片表现极为相似,临床上经常被误诊为肺结核。更重要的是,两者的治疗药物选择和疗程显著不同,绝大部分 NTM 对一线抗结核药物耐药,因此早期鉴别结核分枝杆菌和 NTM 感染对于提高治疗效果,减少耐药发生和药物不良反应方面具有重要的临床意义。

结核分枝杆菌特异性荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌特异性 DNA,通常直接采用患者的痰标本进行检测,并在一定程度上可以很好地区分结核分枝杆菌和 NTM。 γ 干扰素释放试验(interferon gamma release assays, IGRAs)是 20 多年来结核分枝杆菌感染免疫诊断的最重要的进展之一,被认为是目前最理想的结核分枝杆菌感染诊断方法之一。通过检测结核分枝杆菌特异性的 γ 干扰素(IFN- γ),可以有效地区分结核分枝杆菌感染和 BCG 疫苗接种引起的免疫应答反应,但 IGRAs 是否能区分结核分枝杆菌和 NTM 感染,目前尚未有文献报道。

本研究通过对 240 例结核分枝杆菌和 94 例 NTM 感染的肺病患者进行 IGRAs 检测,探讨酶联免疫斑点法(enzyme linked immunospot assay, ELISPOT)在肺结核和 NTM 肺病鉴别诊断中的意义,并分析联合应用结核分枝杆菌 DNA PCR 和 IGRAs 是否能提高鉴别诊断的敏感度和特异度。

资料和方法

一、患者来源

选择深圳市第三人民医院 2011 年 1 月至 2013 年 5 月 334 例收住于肺科住院部的肺病患者。纳入标准:所有患者均至少进行了 2 次以上痰培养,痰培养结果均为生长分枝杆菌,同时做了菌种鉴定。结合患者病史、CT 及细菌学等辅助方法确诊为肺结核患者 240 例(其中 2 次菌种鉴定均为结核分枝杆菌共 171 例,牛分枝杆菌共 69 例),NTM 肺病 94 例。所有 NTM 肺病均符合中华医学会结核病学分会制

定的 NTM 肺病的诊断标准^[3],肺结核诊断均符合中华医学会结核病学分会制定的肺结核诊断标准^[4]。

二、主要试剂、仪器和方法

1. 分枝杆菌菌种鉴定方法:(1)痰标本的采集和处理:痰标本消化并离心弃上清,沉淀物用磷酸盐缓冲液重悬,取重悬液置干燥无菌的管中。(2)DNA 的提取:使用美国 QIAGEN 公司, QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAamp 外周血抽取 DNA 小型试剂盒),严格按照提取试剂盒步骤进行操作。(3)PCR 扩增:PCR 扩增试剂盒购自亚能生物技术有限公司,严格按照提取试剂盒步骤进行操作。(4)探针加尾:20 μ l 5 \times 末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)反应缓冲液,其中探针终浓度为 4 μ mol/L,脱氧胸苷三磷酸(dTTP)终浓度为 2 mmol/L, TdT 80 U,加双蒸水至 100 μ l,置 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,再加 0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(pH 值为 8.0)2 μ l 终止反应。(5)反向斑点杂交:取加尾后探针 2 pmol 按顺序点于尼龙膜上,置 60 $^{\circ}$ C 干烤固定 2 h。将生物素标记的 PCR 产物煮沸变性 5 min,冰浴 5~10 min,再将膜芯片放入反应袋中,加入杂交液 5 ml。然后加入变性 PCR 产物 15~20 μ l 混匀、封袋,54 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。最后洗膜芯片,酶结合物与标记 PCR 产物结合,对最后显色结果进行观察和判定。

2. IGRAs 检测方法:(1)血液样品的收集:所有研究对象均采集乙二胺四乙酸抗凝的静脉血 4 ml 分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。(2)ELISPOT 检测体外 IFN- γ 释放水平:分离的 PBMC 在活化后在预包被好的抗体平板中,每孔加入 100 μ l,每孔细胞浓度为 2×10^5 个细胞/孔。背景阴性对照孔中不加入任何刺激物,阳性对照孔每孔加入 5 μ l 浓度为 100 μ g/ml 的植物血凝素(PHA)。加入结核分枝杆菌早期分泌性抗原靶 6(ESAT-6)(本实验室自行制备)和结核分枝杆菌组合多肽抗原(由深圳翰宇药业股份有限公司完成)5 μ g/孔到实验孔。当加完所有的样品之后,盖上板盖,放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养箱培养 16~36 h。第 2 天洗板后加入检测抗体孵育 1 h,再加入亲和素孵育 1 h,最后加入显色剂显色。待显色洗板后,ELISPOT 板斑点计数,ELISPOT 读数系统(BioReader 4000 Pro-X)为德国 BioSys 公司产品。记录斑点的各种参数,做统计分析。(3)结果判断:

通过前期 ROC 曲线确定的阳性阈值,以 ESAT-6 蛋白抗原孔(A 孔)形成的 SFCs ≥ 40 或多肽抗原孔(B 孔)SFCs ≥ 30 判断为阳性^[5-6]。

3. 结核分枝杆菌 DNA PCR 检测:采用凯杰生物工程(深圳)有限公司的结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),严格按照 Light Cycler480 II 型荧光定量检测仪的操作说明和结果判定。

4. 结核分枝杆菌 DNA PCR 和 IGRAs 两种方法联合结果判断:如果两种方法均为阳性或任意一种方法为阳性时,则判断为阳性结果;两种方法检测结果为阴性时,则判断为阴性结果。两种方法联合鉴别肺结核和 NTM 肺病,敏感度=肺结核患者中的阳性结果数量/总的样本数量;特异度=NTM 肺病中阴性结果数量/总的样本数量。

三、统计学方法

应用 GraphPad Prism 5 软件做图表,数据使用 SPSS 17.0 软件进行统计,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,正态分布的数据采用 t 检验,非正态分布的数据采用 Mann Whitney U 检验;计数资料采用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、肺结核和 NTM 肺病患者一般资料比较

240 例肺结核患者中,合并肺外结核 23 例(9.58%)(10 例淋巴结结核、6 例结核性脑膜炎、4 例骨结核、2 例肾结核、1 例肠结核),合并糖尿病 23 例(9.58%),合并 HIV 感染 3 例(1.25%);94 例 NTM 肺病患者中合并糖尿病 7 例(7.45%),合并

HIV 感染 2 例(2.13%);肺结核患者中,男 134 例,女 106 例,年龄 9~81 岁,平均年龄(41.12 \pm 18.03)岁;NTM 肺病患者中,男 48 例,女 46 例,年龄 14~84 岁,平均年龄(44.53 \pm 18.84)岁;两组患者年龄($t=1.53, P>0.05$)、性别($\chi^2=0.62, P>0.05$)之间差异均无统计学意义。

二、肺结核和 NTM 肺病患者中 IGRAs 检测斑点数对比

240 例肺结核患者和 94 例 NTM 肺病患者 A 孔平均斑点数分别为(103.10 \pm 5.66)、(20.11 \pm 2.70);B 孔平均斑点数分别为(96.49 \pm 6.99)、(17.62 \pm 3.52);肺结核患者 IGRAs 检测结果 A 孔和 B 孔斑点平均数均高于 NTM 肺病组,差异均有统计学意义(Z 值分别为-10.24、-8.80, P 值均 < 0.0001),结果见图 1。

三、肺结核和 NTM 肺病患者结核分枝杆菌 DNA PCR 和 IGRAs 检测结果分析

240 例肺结核患者中痰结核分枝杆菌 DNA PCR 检测阳性率为 74.58%(179/240),IGRAs 检测阳性率为 77.08%(185/240);94 例 NTM 肺病患者中,结核分枝杆菌 DNA PCR 检测阳性率为 10.64%(10/94),IGRAs 检测阳性率为 20.21%(19/94),结果见图 2。两组患者中结核分枝杆菌 DNA PCR 和 IGRAs 检测在鉴别诊断肺结核和 NTM 肺病敏感度分别为 74.58%(179/240)、77.08%(185/240),特异度分别为 89.36%(84/94)、79.79%(75/94);两种方法联合检测敏感度为 93.75%(225/240),特异度为 77.66%(73/94)(表 1)。

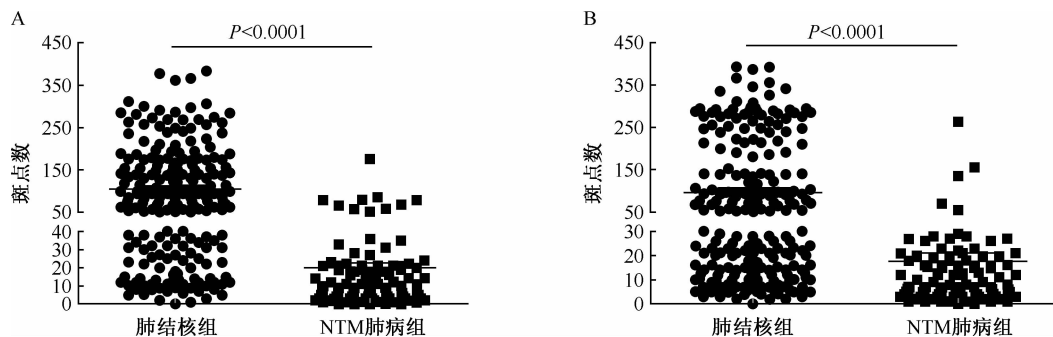


图 1A 为结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白抗原;图 1B 为结核分枝杆菌组合多肽抗原。纵坐标断开是因为 A 孔是以 SFCs ≥ 40 或 B 孔以 SFCs ≥ 30 判断为阳性

图 1 IGRAs 检测肺结核患者组和 NTM 肺病患者组外周血 PBMCs 中抗原特异性 IFN- γ 斑点形成个数(SFCs)

表 1 240 例肺结核和 94 例 NTM 肺病患者 IGRAs 和结核分枝杆菌 DNA PCR 检测结果分析

检测项目	肺结核(例)		NTM 肺病(例)		敏感度(%)	特异度(%)
	阳性	阴性	阳性	阴性		
IGRAs	185	55	19	75	77.08	79.79
结核分枝杆菌 DNA PCR	179	61	10	84	74.58	89.36
IGRAs 和 PCR 联合检测	225	15	21	73	93.75	77.66

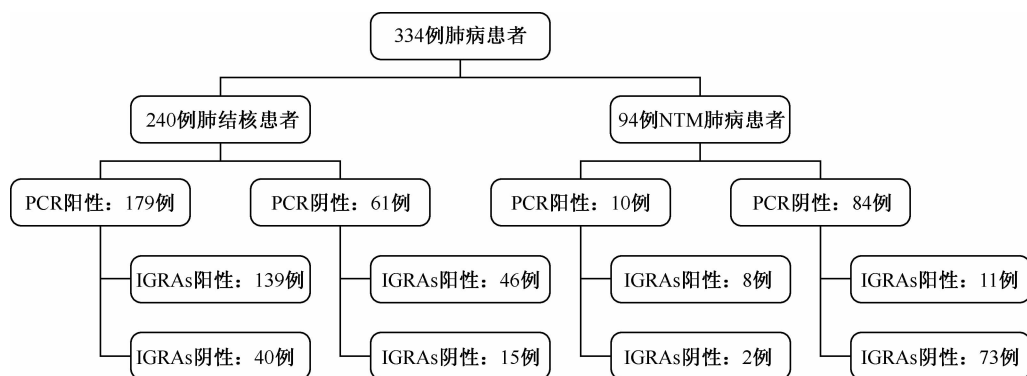


图2 240例肺结核和94例NTM肺病患者结核分枝杆菌DNA PCR和IGRAs检测结果分析

讨论

由于NTM对大多数抗结核药物呈原始耐药^[7],因此NTM肺病与肺结核在临床治疗方案的选择上截然不同。NTM肺病对一线抗结核药物耐药率高达97%以上^[8],目前尚无特异、高效的药物,临床上首选多种药物(如氟喹诺酮类、大环内酯类、氨基糖苷类加上部分抗结核药物)联合使用,并延长治疗疗程。所以,早期诊断和治疗NTM肺病,对控制该病具有重要意义。NTM肺病的病史、临床症状与肺结核十分相似,病程初期常被误诊为肺结核,所以仅从病史、临床症状等方面难以区分二者。

一、结核分枝杆菌PCR检测在鉴别诊断NTM肺病与肺结核的优缺点

目前传统鉴别结核分枝杆菌和NTM的方法主要是以细菌学为主,通过痰液(或其他临床样品)培养出分枝杆菌,然后通过生化鉴定或测序来进行菌种鉴定,费时约4周,延误了患者的早期合理治疗,使患者处于盲目用药状态。而结核分枝杆菌特异性荧光定量PCR因其具有快速、分辨率高等特点,在鉴定分枝杆菌菌种方面已在国内外实验室广泛开展。有研究显示,PCR扩增结核分枝杆菌DNA应用于结核病诊断特异度为100.0%,敏感度为74.1%^[9]。本研究显示:在肺结核患者中PCR敏感度为74.58%,但是在NTM肺病患者中出现了10.64%的结果为阳性,考虑与以下因素有关:(1)可能因为自身引物设计难以对NTM及亚种进行正确鉴定;(2)实验操作过程中的质量控制问题。但由于实验过程均在超净台上进行,因此考虑前者可能性较大。

二、IGRAs检测在鉴别诊断NTM肺病与肺结核中的意义

酶联免疫斑点技术(ELISOPT)是一种基于外周血淋巴细胞培养检测 γ 干扰素释放技术(IGRAs),

IGRAs使用的是结核分枝杆菌特异性抗原ESAT-6和CFP10,其编码基因位于RD1区,而RD1在BCG和绝大多数NTM的基因组中是缺失的,因此,理论上能够区分结核分枝杆菌感染和NTM感染^[10]。多项研究也证明ELISOPT对结核病诊断的敏感度、特异度高,是一种快速高效的检查手段^[11-12]。本研究结果显示:ELISOPT检测在肺结核患者中敏感度为77.08%,同时ELISOPT检测ESAT-6及多肽斑点平均数在两组患者中差异有统计学意义($P<0.01$),这说明ELISOPT检测能鉴别肺结核与NTM肺病,但是在NTM肺病中出现了20.21%的阳性率,考虑可能与鸟分枝杆菌等少数NTM抗原与结核分枝杆菌有交叉引起。

三、IGRAs与结核分枝杆菌PCR联合检测在鉴别诊断NTM肺病与肺结核中的意义

现有的各种诊断NTM肺病检测方法各有利弊,目前仍未能建立早期、快速、敏感和特异的标准诊断技术。因此,找到一种方便迅速、敏感度高、特异度高的检测方法,对NTM肺病的预防和早期诊断及治疗尤为重要。通过本研究发现,两组患者中结核分枝杆菌DNA PCR和IGRAs检测在鉴别诊断肺结核和NTM肺病敏感度分别为74.58%、77.08%,特异度分别为89.36%、79.79%;两种方法联合检测敏感度为93.75%、特异度为77.66%。这一结果表明:联合应用PCR和ELISPOT检测肺结核和NTM肺病能大大提高诊断准确性;尤其是痰涂片阳性的患者,早期联合应用PCR和ELISPOT检测方法,可尽早为临床治疗方案的确定提供依据。因此,在临床实践中,结合患者既往病史、临床表现,将PCR和ELISPOT检测方法相结合,发挥各自的优势,可以快速、准确、有效及早期鉴别诊断肺结核和NTM肺病,进而指导临床医生正确用药,减轻患者痛苦和社会资源的浪费。

参 考 文 献

- [1] 唐神结,沙巍,肖和平,等. 非结核分枝杆菌病的研究进展. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(7): 527-531.
- [2] 梁莉,张滢蓉,乐军,等. 上海市非结核分枝杆菌感染趋势及耐药分析. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(7): 895-897.
- [3] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与处理指南. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(11): 650-653.
- [4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2): 70-74.
- [5] 陈心春,廖明凤,朱秀云,等. 结核菌特异性 IFN- γ Elispot 检测在活动性结核病和结核感染诊断中的应用. 中国防痨杂志, 2010, 32(11): 747-751.
- [6] 杨倩婷,徐平,曾剑锋,等. 结核分枝杆菌 IFN- γ 酶联免疫斑点检测的建立和初步应用. 中国防痨杂志, 2009, 31(3): 144-148.
- [7] 吴龙章,李一耕,罗一鲁,等. 4587 株分枝杆菌菌种鉴定与药敏试验结果分析. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(2): 105-106.
- [8] 吴龙章,谭守勇,谭耀驹,等. 1819 株非结核分枝杆菌行药物敏感性试验的结果分析. 中国防痨杂志, 2012, 34(12): 821-824.
- [9] 彭志文. 聚合酶链反应检测结核分枝杆菌的临床应用价值. 检验医学与临床, 2010, 7(14): 1490-1491.
- [10] 王森,张文宏. 潜伏性结核感染的诊治进展. 微生物与感染, 2008, 3(4): 234-237.
- [11] 刘媛媛,宝福凯,柳爱华,等. γ 干扰素与结核病关系研究进展. 中国热带医学, 2012, 12(10): 1275-1281.
- [12] 刘晓清,张丽帆. γ 干扰素释放分析 T-SPOT. TB 在诊断结核感染中的研究进展. 中国实验诊断学, 2010, 14(12): 2065-2068.

(收稿日期:2014-04-18)

(本文编辑:郭萌)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于《中国防痨杂志》刊出论文中英文缩写的最近公告

为了方便作者撰写论文,同时又符合国家有关部门对于文内英文缩写的规定,特对于本刊常用的可以用缩写形式表述的医学名词和组织、单位名称的缩写公告如下,以后凡是在论文中遇到公告中提到的“名词与名称”,作者可以直接采用英文缩写(但是中英文文题中相关“名词与名称”一般不主张采用缩写)。

逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR); 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR); 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA); 质/荷比(m/z); 信噪比(S/N); 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb); 结核病(tuberculosis, TB); (抗结核药物)固定剂量复方制剂(fixed-dose combination, FDC); 异烟肼(isonicotiny hydrazide, INH 或 H); 利福平(rifampicin, RFP 或 R); 乙胺丁醇(ethambutol, EMB 或 E); 链霉素(streptomycin, Sm 或 S); 氧氟沙星(ofloxacin, Ofx); 左氧氟沙星(levofloxacin, Lfx); 莫西沙星(moxifloxacin, Mfx); 卡那霉素(kanamycin, Km); 吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA); 利福喷丁(rifapentine, Rft); 利福布丁(Rifabutin, Rfb); 阿米卡星(amikacin, Am); 对氨基水杨酸

(paminosalicylic acid, PAS); 卷曲霉素(capreomycin, Cm); 耐药结核病(drug-resistant tuberculosis, DR-TB); 耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB); 广泛耐药结核病(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB); 获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS); 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV); 直接观察(面视)下的短程化疗(directly observed treatment short-course, DOTS), “现代结核病控制策略”也可简称“DOTS 策略”; 世界卫生组织(World Health Organization, WHO); 疾病预防控制中心(center for disease control and prevention, CDC); 早期分泌性抗原靶 6(early secreting antigenic target-6, ESAT-6); γ 干扰素释放试验(interferon gamma release assays, IGRAs); 非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM); 外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs); γ 干扰素(interferon-gamma, IFN- γ); 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α); 白细胞介素(interleukin, IL)。

本刊编辑部