

• 短篇论著 •

结核感染 T 细胞 γ 干扰素释放实验的不确定结果分析*

杜利君¹, 张 兵¹, 李 欣¹, 杨 波¹, 邢 晏^{2△}

(1. 南充市中心医院/川北医学院第二临床学院检验科, 四川南充 637000;

2. 西华师范大学数学与信息学院, 四川南充 637000)

摘 要:目的 了解该院可疑结核感染患者或需排除结核感染患者的 γ -干扰素释放试验(IGRAs)检测的不确定结果发生率, 探讨该结果产生的原因。方法 回顾分析 2014 年 7 月至 2018 年 7 月该院 1 781 例可疑结核感染患者或需排除结核感染患者 IGRAs 检测结果, 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。结果 1 781 例 IGRAs 检测样本, 不确定结果 61 例(3.43%)。男、女患者不确定结果发生率分别为 3.34%, 3.58%, 差异无统计学意义($\chi^2=0.073, P=0.784$)。与 18~65 岁年龄组比较, <18 岁组和 ≥ 65 岁年龄组 ITRs 发生率较高, 差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 10.584、9.015; $P=0.001, 0.003$)。自身免疫性疾病、HIV 感染患者的 ITRs 与确定结果(阴性/阳性)差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 不确定结果发生不仅与年龄因素关系密切, 还与患者的免疫功能状态或免疫抑制剂的使用密切相关。

关键词: γ -干扰素释放试验; 不确定结果; 结核分枝杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.027

中图法分类号: R446.6

文章编号: 1673-4130(2019)14-1773-04

文献标识码: B

结核病是一种由结核分枝杆菌(MTB)感染引起的传染病, 严重危害着人类的生命健康。根据世界卫生组织(WHO)2017 年全球结核病报告显示, 2016 年全球结核病发病的人数为 1 040 万, 中国是全球 30 个结核病高负担国家之一^[1]。此外, 在我国甲、乙类传染病病死率中, 肺结核排名第 2 位, 其实实验室诊断率不足 40%^[2]。由于结核病的诊断较为复杂, 既往的细菌病原体检测、结核菌素皮肤试验(TST)、抗结核抗体检测及影像学检查等诊断方法远远不能满足临床需求^[3]。经过不断地研究, 以 T 淋巴细胞免疫为基础的体外 γ -干扰素释放试验(IGRAs)近年来在临床得到广泛应用。IGRAs 检测的基本原理是 MTB 特异性抗原-早期分泌抗原 6(ESAT-6)和培养滤液蛋白 10(CFP-10)在体外刺激全血中的 T 淋巴细胞产生 γ 干扰素($\text{IFN-}\gamma$), 通过酶联免疫吸附测定实验法(ELISA)测定 $\text{IFN-}\gamma$ 水平来判断受检者是否感染 MTB。虽然 IGRAs 已成为国内外结核诊疗指南推荐的重要实验室检测方法^[4-5], 是临床诊断结核病的重要辅助手段, 但在检测过程中, 除了有阴性结果、阳性结果外, 还会产生一定比例的不确定结果(ITRs)^[6]。不确定结果不能反映患者的结核感染状况, 可能引起临床医生诊断 MTB 感染的混乱及正确解释 IGRAs 不确定结果的困难; 此外, 在检测过程中一旦遇到不确定结果, 实验室将重新采集标本复查, 延误报告时间及增加检测成本。因此, 本文通过回顾 2014 年 7

月至 2018 年 7 月在本院检测的可疑结核感染患者或需排除结核感染患者的 IGRAs, 分析不确定结果发生的比率及原因, 为临床了解 IGRAs 不确定结果可能发生的疾病因素及正确解释 IGRAs 不确定结果报告提供依据和思路, 同时为优化试剂盒性能、提高 IGRAs 检测的可靠性和准确性奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾 2014 年 7 月至 2018 年 7 月在本院 1 781 例可疑结核感染患者或需排除结核感染患者的 IGRAs 检测结果, 年龄为(48.23 \pm 19.84)岁, 其中男 1 139 例, 女 642 例。按不同年龄分为 3 组, <18 岁组 163 例, 18~65 岁组 1 100 例, ≥ 65 岁组 518 例。

1.2 仪器与试剂 IGRAs 试剂盒(北京万泰生物药业股份有限公司), 恒温培养箱(上海博迅公司), Mutiskan FC 酶联免疫检测仪(赛默飞世尔仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 IGRAs 试验 严格按照试剂盒说明书操作。采集 4 mL 肝素锂抗凝静脉全血, 2 h 之内送至实验室。按每管 1 mL 全血分装至本底对照培养管(N 管)、测试培养管(T 管)、阳性对照培养管(P 管), 轻柔颠倒混匀 5 次后, 将培养管直立于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中, 温育 22~24 h。将培养后的培养管以 3 000 r/min, 离心 10 min, 通过 ELISA 检测上清液中的 γ -干扰素($\text{IFN-}\gamma$)水平, 酶标仪在波长 450 nm 处测定其吸光度

* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会普及应用项目(18PJ123)。

△ 通信作者, E-mail: 2004xingyan@163.com。

本文引用格式: 杜利君, 张兵, 李欣, 等. 结核感染 T 细胞 γ 干扰素释放实验的不确定结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(14): 1773-

A,根据试剂盒中校准品制作标准曲线,计算 IFN- γ 水平。

1.3.2 实验室质量控制 由 6 个标准液的吸光度 A 值与相应浓度计算得出的相关系数(r) ≥ 0.99 ; 400 pg/mL 的标准液的平均吸光度 A 值 <1.0 。

1.3.3 判断标准 所得不确定结果均需重新采集样本复查,以排除实验因素引起不确定结果,复查后仍为不确定,则判定为不确定结果,见表 1。

表 1 IGRAs 检测结果的判定标准 (pg/mL)			
N	P-N	T-N	结果判断
≤ 400	任何值	≥ 14 且 $\geq N/4$	阳性
	≥ 20	< 14	阴性
	≥ 20	≥ 14 但 $< N/4$	阴性
	< 20	< 14	不确定
	< 20	≥ 14 但 $< N/4$	不确定
> 400	任何值	任何值	不确定

注: n =本底对照培养管(N管)、T=测试培养管(T管)、P=阳性对照培养管(P管)

1.4 统计学处理 回顾 2014 年 7 月至 2018 年 7 月例患者的 IGRAs 检测结果,用 Excel 2007 软件建立数据库,用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计数资料用百分率表示,组间比较用 χ^2 检验,采用二元 Logistic 回归进行单因素与不确定结果的分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 IGRAs 的检测结果 1 781 例 IGRAs 检测样本,阳性 569 例(31.95%),阴性 1 151 例(64.63%),不确定结果 61 例(3.43%)。

2.2 不同性别患者 IGRAs 的检测结果比较 1 781 例 IGRAs 检测样本中,男性 1 139 例,女性 642 例,男性阳性率为 33.45%,女性阳性率为 29.28%,差异无

统计学意义($\chi^2=3.208, P=0.075$);男、女患者 ITRs 分别为 3.34%,3.58%,差异无统计学意义($\chi^2=0.073, P=0.784$),见表 2。

表 2 不同性别患者 IGRAs 的检测结果比较 [$n(\%)$]				
性别	n	阳性	阴性	ITRs
男	1 139	381(33.45)	720(63.21)	38(3.34)
女	642	188(29.28)	431(67.13)	23(3.58)
合计	1 781	569(31.95)	1 151(64.63)	61(3.43)

2.3 不同年龄组的 IGRAs 的检测结果比较 1 781 例 IGRAs 检测样本中, <18 岁组的患者 IGRAs 阳性率明显低于 18~65 岁组和 ≥ 65 岁组,差异有统计学意义($\chi^2=28.448, P=0.000$);与 18~65 岁组比较, <18 岁组和 ≥ 65 岁组 ITRs 发生率较高,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 10.584、9.015; $P=0.001$ 、0.003)。 <18 岁组和 ≥ 65 岁组 ITRs 发生率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.722, P=0.396$),见表 3。

表 3 不同年龄组的 IGRAs 的检测结果比较 [$n(\%)$]				
组别	n	阳性	阴性	ITRs
<18 岁组	163	23(14.11)	129(79.14)	11(6.75)
18~65 岁组	1 100	357(32.45)	719(65.36)	24(2.18)
≥ 65 岁组	518	189(36.49)	303(58.49)	26(5.02)
合计	1 781	569(31.95)	1151(64.63)	61(3.43)

2.4 检测 IGRAs 的确诊疾病类型与 ITRs 的关系 对 61 例可疑结核感染患者 IGRAs 的 ITRs 标本进行回访,剔除 4 例资料不全患者,经二元 logistic 回归分析,自身免疫性疾病(OR 为 2.84;95%CI 为 1.50~5.39; $P=0.001$)、HIV 感染患者(OR 为 3.04;95%CI 为 1.26~7.35; $P=0.013$)的 ITRs 与确定结果(阴性/阳性)差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

表 4 检测 IGRAs 的确诊疾病类型与 ITRs 的关系					
疾病种类	阴性/阳性 [$n(\%)$]	ITRS [$n(\%)$]	单因素分析		
			OR	95%CI	P
结核病	334(19.42)	9(15.79)	0.78	0.38~1.60	0.496
自身免疫性疾病	162(9.42)	13(22.81)*	2.84	1.50~5.39	0.001
慢性肺部疾病	263(15.29)	5(8.77)	0.53	0.21~1.35	0.183
慢性肾脏疾病	207(12.03)	7(12.28)	1.02	0.46~2.29	0.955
慢性肝脏疾病	182(10.58)	1(1.75)	0.15	0.02~1.10	0.062
糖尿病	89(5.17)	4(7.02)	1.38	0.49~3.91	0.540
心血管疾病	73(4.24)	1(1.75)	0.40	0.06~2.95	0.371
实体癌	195(11.34)	3(5.26)	0.43	0.14~1.40	0.163
血液系统恶性肿瘤	66(3.84)	5(8.77)	2.41	0.93~6.23	0.070
HIV 感染	64(3.72)	6(10.53)*	3.04	1.26~7.35	0.013
其他	85(4.94)	3(5.26)	1.07	0.33~3.49	0.912

注:与阴性/阳性确定结果比较,* $P<0.05$

3 讨 论

目前,大量研究评估了 IGRAs 在疑似结核病患者

诊断中的临床应用价值^[7-8],而较少研究 IGRAs 检测中出现的 uncertain 结果。DIEL 等^[9]研究显示,IGRAs 的不

确定结果发生率在 3%~21%, 不确定的结果可能限制 IGRAs 使用的有效性, 影响结核病的诊断和治疗。因此, 除了关注 IGRAs 检测的阴性或阳性结果之外, 还应重视 IGRAs 不确定结果发生的比例和原因, 为临床疾病的诊断和治疗提供帮助。

本研究显示临床怀疑或者需排除结核感染的患者检测 IGRAs 的不确定结果发生率为 3.43%, 与 TEBRUEGGE 等^[10] 研究基本一致, 不确定结果主要在患有慢性疾病如风湿性疾病^[11] 或免疫功能低下^[12] 的患者中出现, 而产生不确定结果的潜在性因素可能主要是由于阳性对照管弱应答植物血凝素(PHA) 的刺激, 产生低水平的 IFN- γ ; 或者少量患者出现无 PHA 刺激的本底对照管的高水平 IFN- γ 背景^[13-14]。本研究显示, 不确定结果在 <18 岁组与 ≥ 65 岁组发生率较高, 而在 18~65 岁组较低, 提示免疫功能是否完善在 IGRAs 的不确定结果发生中具有重要作用, 儿童青少年免疫功能尚处在发育阶段, 老年人免疫功能逐渐衰老, 年龄可能是 PHA 诱导 IFN- γ 应答高低的关键因素, 使用年龄特异性的阳性对照截断值, 或掺入另一种产生相似的阳性对照刺激物, 可能提高 IGRAs 试剂盒在儿童青少年和老年人群中的检测性能, 降低不确定结果的发生率^[10]。此外, 本文未发现性别与 IGRAs 的不确定结果发生率的差异, 在关于性别与不确定结果的关系研究中, 研究的结论并不一致, BEFFA 等^[15] 通过对 1 429 例患者如有结核接触史、或 TST(+)、或结核病、或可疑结核患者进行分析, 认为性别与不确定结果的发生无关; 而 JUNG 等^[16] 通过对 631 例风湿疾病患者的研究, 发现女性与 IGRAs 不确定结果发生更为密切, 性别与不确定结果关系研究结论不一致可能与纳入研究对象的疾病类型、样本数量、种族、地理来源、卡介苗接种史和伴随免疫抑制剂的标准治疗使用有着密切的关系^[17]。

免疫功能低下或机体长期处于慢性炎症的作用下, 可能增加活动性结核病的发病风险^[18], 患者的 IGRAs 不确定结果与免疫功能低下和慢性炎症密切相关^[19-20]。因此, 进一步回顾分析了 1 781 例患者的疾病种类, 以判断不确定结果发生的危险因素, 结果显示自身免疫性疾病、HIV 感染患者的不确定结果与确定结果(阴性/阳性)差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示不确定结果的发生可能与自身免疫性疾病、HIV 感染患者关系密切。在自身免疫性疾病的发病机制中, 发挥关键作用的 TH17 炎症通路下调了由 Th1 途径产生的 IFN- γ 水平, 此外, 在治疗过程中使用免疫抑制剂、导致免疫功能低下、使全血中的 T 淋巴细胞体外低应答 PHA 的刺激, 阳性对照管产生较低水平的 IFN- γ ^[20]。HIV 感染患者不确定结果的发生可能与 HIV 病毒感染攻击 CD4⁺ T 细胞, 使 T 细胞功能丧失, 导致低应答 PHA 刺激有关, 值得注意的是, 在中晚期免疫缺陷患者中, 不确定的 IGRAs 结果将增加严重临床事件发生的风险。此外, 研究者未发现不确

定结果与慢性炎症组的关系, 可能与本次研究纳入的样本量较小有关。

本研究属于回顾性研究, 存在一定的局限性。未评估不确定结果与临床免疫抑制剂的使用情况, 与反映免疫功能的实验室指标的关系, 如淋巴细胞数量、清蛋白水平、CD4⁺ 细胞计数等, 以及未评估其他可能影响不确定结果的检测因素, 如标本采集及处理时间、标本送检的季节和温度, 及技术错误等。

综上所述, 通过回顾分析本院检测的可疑结核感染患者或需排除结核感染患者 IGRAs 的不确定结果发生的比率及原因, 发现不确定结果发生不仅与年龄因素关系密切, 还与患者的免疫功能状态或免疫抑制剂的使用密切相关。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. WHO/HTM/TB/2017. 23 [R]. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [2] 王丽萍, 曾令佳, 任翔, 等. 中国 2013 年报告法定传染病发病及死亡特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(3): 194-198.
- [3] 高孟秋. γ -干扰素释放试验检测结果的临床意义解读[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(10): 742-743.
- [4] GERALD H, JOHN J, ANDREW V, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection-united states [J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(5): 1-25.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断: WS 288-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [6] YUN J W, CHUNG H S, KOH W J, et al. Significant reduction in rate of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test by shortening incubation delay [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 90-94.
- [7] 刘红, 黄永杰, 王静, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在疑似结核病患者诊断中的价值研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(3): 192-196.
- [8] 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[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014, 37(10): 744-747.
- [9] DIEL R, LODDENKEMPER R, NIENHAUS A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB; a meta analysis[J]. Chest, 2010, 137(4): 952-968.
- [10] TEBRUEGGE M, DE GRAAF H, SUKHTANKAR P, et al. Extremes of age are associated with indeterminate QuantiFERON-TB Gold assay results[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(7): 2694-2697.
- [11] KAUR M, SINGAPURA P, KALAKOTA N, et al. Factors that contribute to indeterminate results from the quantiferon-tb gold in-tube test in patients with inflammatory bowel disease [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2018, 16(10): 1616-1621.
- [12] DAI Q, QIAO K, ZHANG S, et al. Influential factors of the indeterminate results tested by QuantiFERON-TB

- Gold In-Tube (QFT-IT) assay for diagnosing TB infection in HIV-infected patients[J]. Clin Lab, 2016, 62(9): 1761-1766.
- [13] FABRE V, SHOHAM S, PAGE K R, et al. High proportion of indeterminate quantiFERON-TB gold intube results in an inpatient population is related to host factors and preanalytical steps[J]. Open Forum Infect Dis, 2014, 1(2): ofu088.
- [14] HUANG C T, RUAN S Y, TSAI Y J, et al. Effects of acute critical illnesses on the performance of interferon-gamma release assay[J]. Sci Rep, 2016, 25(6): 19972.
- [15] BEFFA P, ZELLWEGER A, JANSSENS J P, et al. Indeterminate test results of T-SPOT. TB performed under routine field conditions[J]. Eur Respir J, 2008, 31(4): 842-846.
- [16] JUNG H J, KIM T J, KIM H S, et al. Analysis of predictors influencing indeterminate whole-blood interferon-gamma release assay results in patients with rheumatic diseases[J]. Rheumatol Int, 2014, 34(12): 1711-1720.
- [17] SHARNINGHAUSEN J C, SHAPIRO A E, KOELLE D M, et al. Risk factors for indeterminate outcome on interferon gamma release assay in Non-US-Born persons screened for latent tuberculosis infection[J]. Open Forum Infect Dis, 2018, 5(8): ofy184.
- [18] FURST D E, CUSH J, KAUFMANN S, et al. Preliminary guidelines for diagnosing and treating tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis in immunosuppressive trials or being treated with biological agents[J]. Ann Rheum Dis, 2002, 61(2): 62-63.
- [19] CALABRESE C, OVERMAN R A, DUSETZINA S B. Evaluating indeterminate interferon-gamma-release assay results in patients with chronic inflammatory diseases receiving immunosuppressive therapy[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2015, 67(8): 1063-1069.
- [20] LANGE B, VAVRA M, KERN W V, et al. Indeterminate results of a tuberculosis-specific interferon-gamma release assay in immunocompromised patients[J]. Eur Respir J, 2010, 35(5): 1179-1182.
- (收稿日期: 2019-01-06 修回日期: 2019-03-26)

• 短篇论著 •

狼疮性肾炎患者血清和尿液中 IL-18 和 KIM-1 的表达水平及临床意义

曾志能

(桂林医学院附属医院检验科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨狼疮性肾炎(LN)患者血清和尿液中白细胞介素-18(IL-18)和肾损伤分子-1(KIM-1)的水平变化及其临床意义。方法 选取该院 2016 年 10 月至 2017 年 9 月收治的 LN 患者 60 例作为 LN 组, LN 患者根据系统性红斑狼疮疾病活动指数 2000(SLEDAI-2000)评分系统分为 LN 活动组(SLEDAI 评分 ≥ 10 分) 35 例和非活动组(SLEDAI 评分 < 10 分) 25 例;再按照 ds-DNA 抗体是否阳性分为抗 ds-DNA 抗体阳性组 35 例, 抗 ds-DNA 抗体阴性组 25 例,另选取该院体检健康者 60 例作为对照组。比较两组患者临床资料,并采用酶联免疫吸附试验法(ELISA)测定血清及尿液中 IL-18 和 KIM-1 的表达水平。结果 3 组血清和尿液 IL-18 和 KIM-1 水平比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);其中 LN 活动组血清和尿液 IL-18 和 KIM-1 水平明显高于非活动组与对照组,非活动组血清和尿液 IL-18 和 KIM-1 水平明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$);LN 患者血清和尿液中 IL-18 和 KIM-1 水平在抗 ds-DNA 抗体阳性组与抗体阴性组之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);根据相关性结果显示:LN 患者血清中的 IL-18 和 KIM-1 水平与白细胞计数、C 反应蛋白、尿蛋白定量之间均呈负相关($P < 0.05$),且补体 C3、补体 C4、红细胞沉降率及 SLEDAI 评分之间均呈正相关;LN 患者尿液中的 IL-18 和 KIM-1 水平与白细胞计数、补体 C3、补体 C4 之间呈负相关,且 C 反应蛋白、尿蛋白定量、红细胞沉降率及 SLEDAI 评分之间均呈正相关($P < 0.05$)。结论 LN 患者血清和尿液中 IL-18 和 KIM-1 的水平均增高,说明 IL-18 和 KIM-1 在 LN 发病机制中起着一定的作用,且二者联合检测可作为评估 LN 严重程度及监测病情的活动性指标。

关键词:狼疮性肾炎; 白细胞介素-18; 肾损伤分子-1

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.028

中图法分类号:R593.242

文章编号:1673-4130(2019)14-1776-04

文献标识码:B

狼疮性肾炎(LN)不但是系统性红斑狼疮(SLE)常见的并发症之一,而且是继发性肾病导致终末期肾

衰竭的一种疾病^[1]。多见于中、青年女性,其发病与免疫复合物形成、免疫细胞和细胞因子等免疫异常有