

· 临床论著 ·

运用ROC曲线对 γ -干扰素释放试验、 抗-结核分枝杆菌及其组合 在涂阴肺结核诊断中的效能分析

沈兴华¹ 张晓龙² 唐佩军¹ 王雪峰³ 胥萍¹ 陈兴年¹ 汤伟¹ 吴妹英¹

【摘要】目的 探讨 γ -干扰素释放试验(IGRA)、抗-结核分枝杆菌及其组合在肺结核诊断中的应用价值。**方法** 回顾性调查苏州大学附属传染病医院结核科于2013年6月至2014年12月收治的符合要求、资料完整的疑似肺结核病例共512例,采用IGRA试剂盒检测其血浆 γ -干扰素含量,同时应用蛋白芯片识别仪检测其结核分枝杆菌蛋白16 kDa和38 kDa以及抗-脂阿拉伯甘露糖(Lam)含量,应用ELISA检测抗-结核分枝杆菌(TBAb),并将5种检测结果进行平行分析。**结果** 在涂阴肺结核的单一检测指标中,IGRA的AUC最大,诊断效能最好。在各项指标联合检测中,二联组合16 kD+IGRA和三联组合IGG+16 kD+IGRA较好,且两种组合的检验效能差异无统计学意义($Z=1.622$ 、 $P=1.107$),AUC分别为0.694和0.667,灵敏度分别为82%和96%,特异度分别为57%和36%。**结论** 多项检测指标联合较单一指标检测能够提高涂阴肺结核诊断的灵敏度。16 kD+IGRA和IGG+16 kD+IGRA为IGRA、抗-分枝杆菌在涂阴肺结核诊断中的最优组合。

【关键词】 γ -干扰素释放试验;结核分枝杆菌;蛋白芯片;抗体;诊断

Efficiency of interferon-gamma release assay, anti-*Mycobacterium tuberculosis* and the combination in the diagnosis of tuberculosis Shen Xinghua¹, Zhang Xiaolong², Tang Peijun¹, Wang Xuefeng³, Xu Ping¹, Chen Xingnian¹, Tang Wei¹, Wu Meiyong¹. ¹Department of Tuberculosis, The Fifth Affiliated Infectious Hospital of Soochow University, Suzhou 215007, China; ²Department of Tuberculosis Control, Suzhou Center For Diseases Prevention and Control, Suzhou 215007, China; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Soochow University, Suzhou 215123, China.

Corresponding author: Wu Meiyong, Email: wu_my@126.com

【Abstract】Objective To investigate the potential value of interferon-gamma release assay (IGRA) and detection of anti-*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in the diagnosis of tuberculosis. **Methods** Data of 512 cases with suspected tuberculosis diagnosed from June 2013 to December 2014 in Department of Tuberculosis, the Fifth Affiliated Infectious Hospital of Soochow University were analyzed, retrospectively. The concentration of interferon-gamma in blood plasma were detected by the IGRA kit. The concentration of anti-MTB-16 kD, anti-MTB-38 kD and anti-lipoarabinomannan (Lam) were detected by protein chip recognition instrument. The level of anti-tuberculosis (TBAb) was analyzed by ELISA method. The accuracy of diagnosis of tuberculosis based on single measurement or combination of them were evaluated through parallel comparison. **Results** For the cases with smear negative pulmonary tuberculosis, AUC of IGRA was the largest, indicating the best diagnostic accuracy. When combined with these indicators, a duplex combination of 16 kD + IGRA and a triple combination of IGG + 16 kD + IGRA showed better accuracy, but with no significant difference between the two combinations ($Z=1.622$, $P=1.107$). The AUC,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.06.007

基金项目: 十二五传染病防治国家科技重大专项(No. 2013ZX10003008-003-001); 2014年苏州市临床重点病种诊疗技术专项项目(No. LCZX201314); 2014年江苏省预防医学会科研课题(No. Y2013023); 2015年苏州市临床重点病种诊疗技术专项项目(No. LCZX201414); 苏州市卫生局科教兴卫青年科技项目(No. KJXW2013033)

作者单位: 215007 苏州市, 苏州大学附属传染病医院结核科¹; 215007 苏州市, 苏州市疾病预防控制中心结核病防制所²; 215123 苏州市, 苏州大学医学部基础医学与生物科学学院³

通讯作者: 吴妹英, Email: wu_my@126.com

sensitivity and specificity values of combination of 16 kD + IGRA were 0.694, 82% and 57%, respectively. The AUC, sensitivity and specificity values of combination of IGG + 16 kD + IGRA were 0.667, 96% and 36%, respectively. **Conclusions** Comparing with the single parameter, the combined multiple parameters may improve the sensitivity of diagnosis in smear negative pulmonary tuberculosis. The significant combinations of parameters in diagnosing smear negative pulmonary tuberculosis are 16 kD + IGRA and IGG + 16 kD + IGRA.

【Key words】 Interferon-gamma release assay; *Mycobacterium tuberculosis*, Protein chip; Antibody; Diagnosis.

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的肺结核 (pulmonary tuberculosis, PTB) 为世界范围内的重大传染性疾病。全球约1/3人口感染MTB^[1]。目前临床工作中面临的困惑是虽然诊断技术逐步更新但患者漏诊、误诊仍不容忽视, 现有结核病诊断方法中, 虽然细菌学检查 (包括涂片和培养) 是结核病诊断的金标准, 但敏感性较低且耗时长, 影像学、结核分枝杆菌素试验、抗体检查、分子诊断方法等均存在一定的局限性^[2-3], 因此, 研发新型诊断及各诊断方法组合对结核病进行早期诊断与治疗具有十分重要的意义。2014年, 分子生物学技术进一步被广泛应用于潜伏感染、结核病、耐药结核病和非结核分枝杆菌等方面^[4]。分子生物学技术诊断结核病具有快速、方便和生物安全性高等优点, 显示其良好的应用前景。以T细胞免疫为基础的体外 γ -干扰素释放试验 (interferon-gamma release assay, IGRA) 被证实结核分枝杆菌感染检测中有较好的敏感性和特异性^[5-7]。IGRA将结核分枝杆菌特异性抗原加入受试者的血液标本或者含有分离出的外周血单核细胞的培养基中进行孵化, 如果受试者曾受过结核分枝杆菌感染, 记忆T细胞就会对这些特异性抗原产生反应, 发生增殖分化并释放出 γ -干扰素以及其他一些细胞因子, 通过ELISA/ELISPOT方法定量检测 γ -干扰素的释放水平, 以诊断是否存在结核分枝杆菌感染^[8]。IGRA主要用于结核分支杆菌感染而非活动性结核病的诊断。诊断活动性结核时, IGRA结果只能作为辅助指标而非核心指标, 须结合临床。但这一建议更多采用了国际经验而非国内证据^[9]。作为结核病高发国家, 我国也需积累更多国内的数据。本研究采用武汉海吉力生物科技有限公司自主研发的人 γ -干扰素检测试剂盒对于本院收治行鉴别诊断及治疗的患者进行检测, 同时与结核蛋白芯片和TBAb结果进行比较, 以受试者工作特征 (receiver operation characteristic, ROC) 曲线评价其各自以及各种组合在肺结核诊断中的价值。

资料与方法

一、研究对象

本研究搜集苏州市附属传染病医院结核科于2013年6月至2014年12月收治的资料完整的痰涂阴肺结核及肺部非结核病例为研究对象。

入选标准: 有咳嗽、咯痰症状、胸部X线片或胸部CT显示肺部有阴影。入选患者分为两组: 痰涂阴肺结核组和其他肺部疾病组。涂阴肺结核诊断主要是根据临床症状、痰检及影像检查并参照肺结核的诊断标准排除其他疾病后确诊; 涂阴肺结核的诊断标准: ①具有典型的肺结核临床症状和胸部X线表现。②抗结核治疗有效。③临床可排除其他非结核性肺部疾患。④直接痰涂片镜检抗酸杆菌阴性。⑤支气管或肺部组织病理检查证实结核性改变。其他肺部疾病: 包括肺炎、肺癌、支气管扩张、肺隔离症和慢性阻塞性肺病等。均排除原发性免疫缺陷性疾病, 接受放、化疗以及免疫抑制药物治疗患者以及合并糖尿病患者, 避免受试者因免疫损害所致IGRA假阴性。

二、主要试剂和设备

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒 (武汉海吉力生物科技有限公司); 结核分枝杆菌蛋白芯片检测系统及PBT-X2蛋白芯片阅读器 (南京大渊生物技术工程有限公司); 抗-结核分枝杆菌诊断试剂盒 (上海奥普生物医药有限公司); MK-3酶联仪 (芬兰雷勃公司), BHC-II B2 二级生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司), RT-2600C全自动洗板机 (深圳Rayto公司) 等。

三、IGRA检测

采集研究对象静脉血, 肝素钠抗凝, 于室温储存和运输, 16 h内进行样品刺激, 避免反复冻融, 严格按照试剂盒说明书操作。

四、结核分枝杆菌蛋白芯片检测

结核分枝杆菌蛋白16 kD和38 kD以及脂阿拉伯甘露糖 (lipoarabinomannan, Lam) 检测按试剂盒说

说明书进行,结果根据仪器厂家设置参数自动判别。

五、抗-结核分枝杆菌(tuberculosis antibody, TBAb)检测

严格按照上海奥普生物医药有限公司结核分枝杆菌抗体诊断试剂盒(胶体金法)说明书进行操作。

六、联合组合判定标准

结合结核病发病与治疗特点,采用平行试验,即16 kD检测、38 kD检测、IGG检测、Lam检测、IGRA检测中任意二联、三联及四联检测中只要有一个检测结果呈现阳性就判定为联合阳性。

七、统计学处理

应用SPSS 19.0软件和MedCalc 12.0软件进行统计分析,计数资料两组率的比较用 χ^2 检验。以灵敏度(%)作为纵坐标,100-特异度(%)作为横坐标绘制ROC曲线,评价各种检测指标的检验效能,曲线下面积(area under the curve, AUC)比较采用Z检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、涂阴肺结核组与肺部非结核疾病组患者的一般资料

本研究共纳入符合要求的病例512例,其中涂阴肺结核195例,男性141例,女性54例;年龄为15~85岁,平均年龄为(38.4 ± 17.85)岁。肺部其他疾病317例,男性223例,女性94例;年龄为16~88岁,平均年龄为(47.98 ± 20.70)岁。38 kD、IGG、IGRA和Lam在涂阴肺结核组的阳性率均显著高于肺部非结核疾病组,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)而两组16 kD指标差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表1。

二、各项检测指标单一、任意二联、三联、四联及五联检测的ROC曲线图分析

1. 图1为单一检测指标AUC(曲线下面积)两两比较:除38 kD指标与Lam指标($Z = 0.405$ 、

$P = 0.686$), IGG指标与Lam指标($Z = 1.919$ 、 $P = 0.055$)的AUC差异无统计学意义,其余指标AUC两两比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.001), IGRA在涂阴肺结核检测中AUC最大(0.7), 诊断效能最好,其次为IGG指标。

2. 二联检测指标灵敏度较高组的检验效能:在灵敏度80%以上的二联检测指标中,特异度为38%~57%, 16 kD + IGRA组的AUC最大(0.694), 诊断效能最好,其灵敏度和特异度分别为82%和57%,见图2。

3. 三联检测指标灵敏度较高组的检验效能:在灵敏度80%以上的3联检测指标中,特异度为

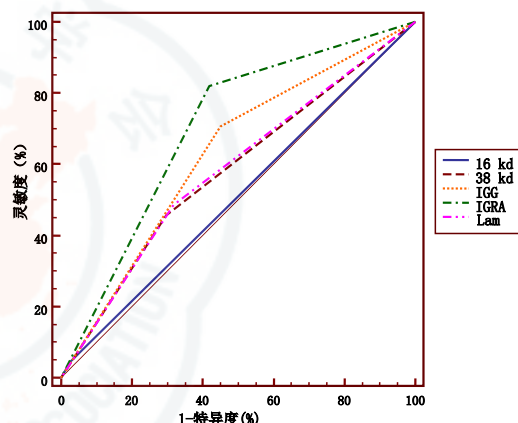


图1 单一检测指标 ROC 曲线

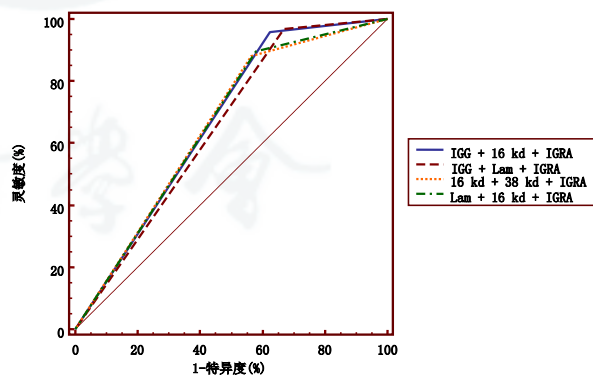


图2 二联检测指标 ROC 曲线

表1 各项检测指标在涂阴肺结核与肺部非结核患者中的阳性率

检测指标	涂阴肺结核组 (n = 195)		肺部非结核疾病组 (n = 317)		χ^2 值	P值
	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)		
16 kD	9	4.6	8	2.5	1.646	0.200
38 kD	89	45.6	94	29.7	13.437	< 0.001
IGG	138	70.8	143	45.1	32.101	< 0.001
IGRA	160	82.1	133	42.0	79.294	< 0.001
Lam	95	48.7	101	31.9	14.520	< 0.001

33%~44%，IGG + 16 kD + IGRA组的AUC最大（0.667），诊断效能最好，其灵敏度及特异度分别为96%和36%，见图3。

4. 四联及五联检测指标灵敏度较高组的检验效能：在灵敏度大于80%的4联及5联检测指标中，特异度为32%~34%，任何两组间AUC差异均无统计学意义（IGG + Lam + 16 kD + IGRA组 vs. 16 kD + 38 kD + IGG + IGRA组， $Z = 0.498$ ， $P = 0.619$ ；IGG + Lam + 16 kD + IGRA组 vs. 38 kD + IGG + Lam + IGRA组， $Z = 0$ ， $P = 1.000$ ；IGG + Lam + 16 kD + IGRA组 vs. 16 kD + 38 kD + IGG + Lam + IGRA组， $Z = 1$ ， $P = 0.317$ ；16 kD + 38 kD + IGG + IGRA组 vs. 38 kD + IGG + Lam + IGRA组比较， $Z = 0.498$ ， $P = 0.619$ ；16 kD + 38 kD + IGG + IGRA组 vs. 16 kD + 38 kD + IGG + Lam + IGRA组， $Z = 0.924$ ， $P = 0.356$ ；38 kD + IGG + Lam + IGRA组 vs. 16 kD + 38 kD + IGG + Lam + IGRA组， $Z = 1$ ， $P = 0.317$ ），见图4。

讨 论

结核病的快速、准确诊断是控制结核病疫情的重要因素，传统的诊断标准是临床症状结合痰结核分枝杆菌涂片及培养检查，痰细菌涂片阳性率较低，痰细菌培养周期长，且50%~60%患者并不能

培养出结核分枝杆菌^[10-11]，临床工作中迫切需要新的检测技术以提高结核病的诊断效能。分子生物学技术诊断结核病具有快速、方便和生物安全性高等优点，具有良好的应用前景。本研究结果显示，在涂阴肺结核的单一检测指标中，IGRA的灵敏度最高（82%），其次为IGG指标（71%），单一检测指标AUC（曲线下面积）两两比较发现，除了38 kD指标与Lam指标，IGG指标与Lam指标的AUC差异无统计学意义（ P 均 > 0.05 ），其余指标AUC两两比较差异均有统计学意义（ P 均 < 0.001 ），IGRA在涂阴肺结核的检测中诊断效能最高，诊断敏感性及其特异性均高于血清结核分枝杆菌抗体试验，与文献报道一致^[12-16]，其次为IGG指标。IGRA通过定量检测结核特异性抗原刺激致敏淋巴细胞后释放在血液中的 γ -干扰素水平，来判断有无结核感染，是一种国际上用于辅助诊断结核感染的新方法。IGRA用于筛查结核潜伏感染时不受卡介苗接种的影响，较少受到非结核分枝杆菌感染的影响^[17-18]。

由于IGRA等分子生物学检测技术阳性结果仅能表示体内有特异性免疫反应，对诊断结核分枝杆菌潜伏感染意义较大，并不能直接诊断活动性结核病，在确诊活动性结核病方面存在一定局限性^[19-20]，为此，本研究对检测技术的组合行进一步分析，以探究是否能提高诊断效能。本研究选定国内大多结核病专科医院常规开展的IGRA和抗-结核分枝杆菌进行联合检测后分析。在灵敏度为80%以上的二联检测指标中，进行AUC两两比较发现。16 kD + IGRA组的诊断效能高于38 kD + IGRA组和Lam + IGRA组。在灵敏度均为80%以上的三联检测指标中，进行AUC两两比较发现IGG + 16 kD + IGRA组合的诊断效能高于IGG + Lam + IGRA组和38 kD + IGG + IGRA组。在灵敏度为80%以上的四联或五联检测指标中，任何两组间AUC两两比较差异均无统计学意义，提示四联及五联检测指标灵敏度较高组的检验效能一致。本研究结果表明，多项检测指标联合较单一检测可提高涂阴肺结核诊断的灵敏度。16 kD + IGRA和 IGG + 16 kD + IGRA为IGRA、抗-分枝杆菌在涂阴肺结核诊断中的最优组合。

以上研究结果提示检测方法的联合应用有利于临床工作中做出结核病诊断，尤其是在涂阴结核病患者早期临床症状不典型难以明确诊断时，减少临床漏诊率及误诊率，以最低成本做出早期、快速和准确诊断。

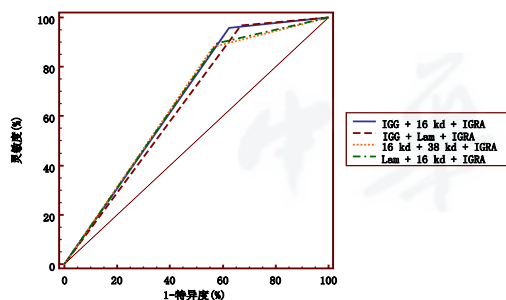


图3 三联检测指标 ROC 曲线

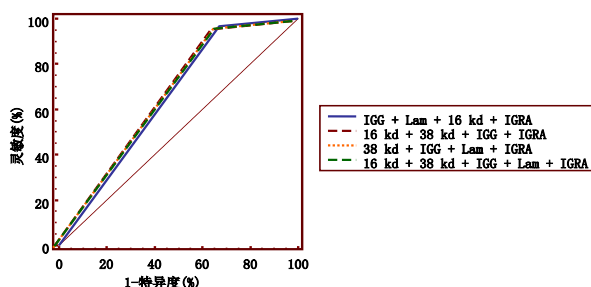


图4 四联及五联检测指标 ROC 曲线

参 考 文 献

- 1 程小星, 蒋静. 免疫诊断技术在肺结核及肺外结核诊断中的价值[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(6): 464-467.
- 2 张雅楠, 刘卫, 张文静, 等. 诊断性治疗确诊的79例结核患者的临床分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(5): 47-49.
- 3 孔忠顺, 管波清, 古淑香, 等. 血清抗脂阿拉伯甘露糖及38 kD抗体检测对涂阴肺结核及肺外结核诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(3): 140-142.
- 4 李亮. 指南助力学科发展 疾病控制尚需努力--2014年结核病诊疗年度回顾[J]. 中华医学信息导报, 2015, 29(1): 12-13.
- 5 Dai Y, Feng Y, Xu R, et al. Evaluation of interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis: an updated meta analysis[J]. Eur J Clin Microbiol, 2012, 31(11): 3127-3137.
- 6 Kim SY, Jung GS, Kim SK, et al. Comparison of the tuberculin skin test and interferon- γ release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection before kidney transplantation[J]. Infection, 2013, 41(1): 103-110.
- 7 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.
- 8 Menzies D, Pai M, Comstock G, et al. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research[J]. Ann Intern Med, 2007, 146(9): 340-354.
- 9 Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection-United States[J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(59): 1-25.
- 10 Tuberculosis 1996. [Serial online]. EPI-NEWS 1997; week 34[EB/OL]. Available from: <http://www.ssi.dk/dk/epi-nyt/1997/uge34.html>.
- 11 Pottumarthy S, Morris AJ, Harrison AC, et al. Evaluation of the tuberculin gamma interferon assay: potential to replace the mantoux skin test[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3229-3232.
- 12 朱春玲, 候远沛, 彭素真, 等. γ -干扰素体外释放试验在结核诊断中的应用评价[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(10): 1833-1835.
- 13 Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States[J]. MMWR Recomm Rep, 2005, 54(RR-15): 49-55.
- 14 Kang YA, Lee HW, Yoon HI, et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in a intermediate tuberculosis-burden country[J]. JAMA, 2005, 293(22): 2756-2761.
- 15 Kanunfre KA, Leite OH, Lopes MI, et al. Enhancement of diagnostic efficiency by a gamma interferon release assay for pulmonary tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(6): 1028-1030.
- 16 Ruan Q, Zhang S, Ai J, et al. Screening of latent tuberculosis infection by interferon- γ release assays in rheumatic patients: a systematic review and meta-analysis[J]. Clin Rheumatol, 2016, 35(2): 1-9.
- 17 Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update[J]. Ann Intern Med, 2008, 147(3): 177-185.
- 18 Khalil KF, Ambreen A, Butt T. Comparison of sensitivity of QuantiFERON-TB gold test and tuberculin skin test in active pulmonary tuberculosis[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2013, 23(9): 633-636.
- 19 Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis[J]. The Lancet, 2000, 356(9235): 1099-1104.
- 20 Dewan PK, Grinsdale J, Kawamura LM, et al. Low sensitivity of a whole-blood interferon- γ release assay for detection of active tuberculosis[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(1): 69-73.

(收稿日期: 2015-11-12)

(本文编辑: 孙荣华)

沈兴华, 张晓龙, 唐佩军, 等. 运用ROC曲线对 γ -干扰素释放试验、抗-结核分枝杆菌及其组合在涂阴肺结核诊断中的效能分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2016, 10(6): 680-684.