论著

文章编号:1000-5404(2013)19-2092-03

全血γ干扰素诱导蛋白-10释放试验对活动性肺结核的诊断价值

罗效梅[1],熊玉霞[1],曹 均[1],王燕妮[1],杨刚毅[2],李 伶[2],廖 涌[1] (400061 重庆,武警重庆总队医院检验科[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院内分泌科[2])

[摘要] **目的** 探讨全血γ干扰素诱导蛋白-10(IP-10)对活动性结核病的辅助诊断价值。**方法** 检测66例活动性肺结核病患者、40例非结核呼吸疾病患者及40例健康对照者血浆中非特异性IP-10的水平;分别应用纯化的结核分枝杆菌特异性蛋白早期分泌性靶抗原-6(EAST-6)和培养液蛋白10(CFP10)体外刺激患者全血,检测活动性结核病组、非结核呼吸疾病组和健康对照组人群全血中IP-10的释放水平;绘制受试者工作特征曲线,比较非特异性IP-10和特异性IP-10对活动性肺结核的诊断效能。**结果** 活动性结核病组患者血浆中非特异性IP-10的水平为(139.6±124.2) pg/mL,明显高于健康对照组[(33.5±17.7)pg/mL, $P<0.05$];而与非结核呼吸疾病组[(88.1±73.3)pg/mL]无明显差别($P>0.05$)。经ESAT-6及CFP10诱导后,活动性结核病组患者全血IP-10释放水平为(146.0±167.1)pg/mL,显著高于非结核呼吸疾病组[(26.6±9.7)pg/mL, $P<0.01$]与健康对照组[(24.2±9.7)pg/mL, $P<0.01$]。经过ROC分析,结核特异性的IP-10诊断结核病的临界值为41.2 pg/mL,敏感度为68.2%,特异度为93.7%。特异性IP-10 ROC曲线下面积为0.905,高于非特异性IP-10(0.747, $P<0.01$)。**结论** IP-10可作为活动性结核病的辅助诊断方法。采用结核特异性IP-10较血浆非特异性IP-10能够提高活动性肺结核的诊断效能。

[关键词] γ干扰素诱导蛋白-10;肺结核;诊断
[中图法分类号] R521.04; R446.112; R446.61 [文献标志码] A

Diagnostic value of whole blood gamma interferon-inducible protein 10 release assay in active pulmonary tuberculosis

Luo Xiaomei[1], Xiong Yuxia[1], Cao Jun[1], Wang Yanni[1], Yang Gangyi[2], Li Ling[2], Liao Yong[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, Chongqing Corps Hospital of Armed Police Force, Chongqing, 400061, [2]Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the clinical value of interferon-inducible protein 10 (IP-10) in auxiliary diagnosis of active tuberculosis. **Methods** The level of non-specific IP-10 was evaluated in the plasma of 66 active tuberculosis patients, 40 non-pulmonary tuberculous patients and 40 healthy controls, and the level of specific IP-10 was detected in the whole blood after stimulated by purified mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT6 and culture filtrate protein 10 (CFP10). Then the receiver operating characteristic (ROC) curve was drawn to determine the diagnostic value of non-specific IP-10 and specific IP-10 to detect active tuberculosis. **Results** The non-specific IP-10 level of the active tuberculosis group (139.6±124.2 pg/mL) was obviously higher than that of the healthy control group (33.5±17.7 pg/mL, $P<0.05$), but had no difference with that of the non-tuberculous pulmonary disease group (88.1±73.3 pg/mL, $P>0.05$). After stimulated by the ESAT6 and CFP10, the specific IP-10 level of active tuberculosis group (146.0±167.1 pg/mL) was significantly higher than that of non-tuberculous pulmonary disease group (26.6±9.7 pg/mL, $P<0.01$) and that of the healthy control group (24.2±9.7 pg/mL, $P<0.01$). After ROC analysis, the threshold of the specific IP-10 for diagnosis of tuberculosis was 41.1 pg/mL and its sensitivity and specificity were 70.8% and 91.8% respectively. The area under curve (AUC) of the specific IP-10 was 0.905, which was obviously higher than that of non-specific IP-10 (0.747, $P<0.01$). **Conclusion** The gamma interferon-inducible protein 10 release assay can be used as auxiliary diagnostic method for active tuberculosis. The diagnostic value of the specific IP-10 is better than that of non-specific IP-10.

[**Key words**] gamma interferon-inducible protein 10; pulmonary tuberculosis; diagnosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30771037). Corresponding author: Liao Yong, E-mail:liaoyong00133@sina.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30771037)
[通信作者] 廖 涌,E-mail:liaoyong00133@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130912.1524.003.html(2013-09-12)

结核病是一种由结核分枝杆菌感染所引起的一种经空气传播、危害巨大的呼吸道传染病，每年感染人数高达800万~1 000万，并有近300万人因此死亡[1]。2010年我国结核病流行病学抽样调查结果显示，结核病年发患者数约为130万，占全球发病的14.3%，居全球第2位[2]。因此，对结核病的早期诊断对控制结核疫情至关重要。近年来，结核感染的实验室诊断不断取得进展，尤以γ干扰素为基础的免疫学诊断研究最为广泛，其对结核病的诊断有较好的敏感性和特异性[3]。有研究表明活动性肺结核患者γ干扰素诱导蛋白-10（interferon inducible protein 10，IP-10）水平显著高于γ干扰素，其检测的灵敏度更高[4-5]，但其能否用于临床诊断还需进一步研究证明。就检测标本而言，有研究以经过结核特异性抗原刺激后的血液作为检测对象[6]，但也有直接使用血浆进行检测[7]，本研究通过ELISA检测活动性结核病患者、非结核呼吸疾病患者及健康对照者血浆中非特异性IP-10水平，以及应用结核分枝杆菌特异性蛋白早期分泌性靶抗原-6（EAST-6）和培养液蛋白10（CFP10）体外刺激后，3组人群全血中结核特异性IP-10的释放水平，并结合ROC曲线比较特异性IP-10和非特异性IP-10对活动性结核的诊断效能，从而明确全血IP-10释放试验对活动性肺结核的辅助诊断价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象

活动性结核病组：66例，来源于武警重庆总队医院2011年1月至2012年6月，根据我国2008年修订的《肺结核诊断标准》确诊为活动性肺结核病的初诊住院患者，其中男性39例，女性27例，年龄14~83（39.6±18.6）岁。研究对象剔除标准：自身免疫性疾病、免疫缺陷性疾病、肿瘤性疾病、过敏性疾病、1个月内患过其他急慢性感染性疾病、1个月内服用过糖皮质激素或免疫抑制剂、既往重大手术或近期外伤史。

非结核呼吸疾病组：40例，来源于本院同期入院的肺炎、肺癌等其他非结核肺部疾病住院患者。其中男性27例，女性13例，年龄18~76（43.2±19.6）岁。

健康对照组：40例，来源于我院体检健康者。男性22例，女性18例，年龄22~50（34.7±9.2）岁。各常规检查及生化指标均正常，并排除其他器质性病变。

1.2 试剂与仪器

CFP10、ESAT-6蛋白购于北京热景生物有限公司，植物血凝素（PHA）购于美国Sigma公司，细胞培养液RPMI1640培养基购于北京Solarbio公司，小牛血清购于杭州四季青公司，IP-10试剂盒购于美国BD公司，酶标检测仪购于深圳雷杜公司。

1.3 研究方法

统一采集住院患者（住院48 h内）、健康对照者肝素抗凝血，血量不低于4 mL，特异性IP-10的测定方法采用王莹等[6]的方法，收集培养上清液，-80 ℃保存。非特异性IP-10：将剩余全血离心，收集血浆，-80 ℃保存。严格按照IP-10测定说明书测定IP-10的含量。

1.4 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 17.0统计软件，行单因素方差分析，使用ROC曲线分析IP-10诊断性能。

2 结果

2.1 各组IP-10水平检测结果

活动性结核病组与非结核病呼吸疾病组结核非特异的IP-10水平明显高于健康对照组（$P<0.05$），而活动性结核病组与非结核呼吸疾病组的差异不具有统计学意义（$P>0.05$）。活动性结核病组特异性IP-10水平显著高于非结核呼吸疾病组（$P<0.01$）和健康对照组（$P<0.01$），而健康对照组与非结核呼吸疾病组差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表1。

表1 各组患者特异性和非特异性IP-10水平检测结果（pg/mL，$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	非特异性IP-10	特异性IP-10
活动性结核病组	66	139.6±124.2[a]	146.0±167.1[bc]
非结核呼吸疾病组	40	88.1± 73.3[a]	26.6±9.7
健康对照组	40	33.5±17.7	24.2±9.7

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与健康对照组比较；c：$P<0.01$，与非结核呼吸疾病组比较

2.2 特异性和非特异性IP-10的ROC分析结果

以诊断结果作为金标准，分析非特异性及特异性IP-10的诊断效率，见图1。特异性IP-10诊断活动性结核病的ROC曲线下面积为0.905（95% *CI*：0.859~0.951 标准误0.023）。诊断结核病的临界值为41.2 pg/mL，敏感度为68.2%，特异度为93.7%；血浆非特异IP-10诊断活动性结核病的ROC曲线，曲线下面积为0.747（95% *CI*：0.665~0.829，标准误0.042），诊断结核病的临界值为80 pg/mL时，敏感性为60.6%，特异性为80.0%；二者曲线下面积比较：$Z=5.034$，$P<0.01$，特异性IP-10的诊断效率高于血浆非特异性IP-10。

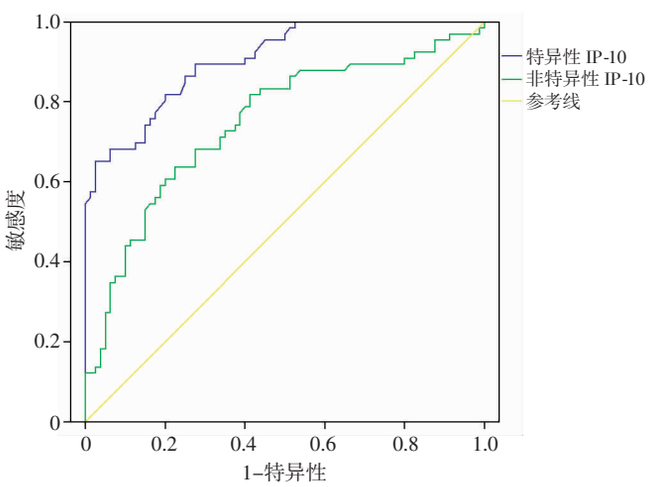


图1 特异性及血浆非特异性IP-10的ROC曲线

3 讨论

IP-10 又名 CXCL10,是由 γ 干扰素和/或脂多糖(LPS)所诱导产生的一种细胞因子,属趋化因子 CXC 类谷氨酸-亮氨酸-精氨酸-(ELR)亚族。目前已发现活化的成纤维细胞、角蛋白细胞、单核/巨噬细胞、内皮细胞和 T 细胞等 30 多种细胞可表达 IP-10。人 IP- 10 的基因表达需要 γ 干扰素的刺激,而且对 γ 干扰素呈剂量依赖性和时间依赖性[8]。作为趋化因子,IP-10 介导 Th1 型炎症反应从而参与了许多疾病的发生、发展过程,在结核免疫中发挥重要作用。Walrath 等[9]的研究表明,在结核菌素试验阳性患者支气管滴注 0.5 U 的结核菌素后,滴注局部组织出现淋巴细胞聚集和炎性反应,聚集的淋巴细胞以 CD4 淋巴细胞为主,并高水平表达 γ 干扰素,这是由于结核菌素滴注组织大量分泌的 IP-10 与支气管细胞上的 CXCR3 结合,趋化活化淋巴细胞至炎症部位并分泌 γ 干扰素所引起。而生理状态下,T 细胞仅分泌少量 IP-10,因此,推测 IP-10 水平检测可辅助诊断结核病。本研究结果显示,活动性肺结核血浆非特异性 IP-10 和结核抗原特异性 IP-10 的值均高于健康对照组和非结核呼吸疾病组,确有诊断价值。

ROC 曲线分析因其不受患病率和诊断阈值的影响,可对 2 个诊断试验的准确度进行综合比较,因而成为目前公认的诊断试验最佳评价指标。本研究以活动性结核病组为阳性组,健康对照组和非结核呼吸疾病组为阴性对照组,构建了 ROC 曲线,确定了 IP-10 的诊断临界值。结果显示,结核抗原特异性 IP-10 诊断活动性结核的曲线下面积、敏感度等与文献[5 - 7, 10]都较为接近,但特异度上却有较大差异。国内王莹等[6]的研究结果与本研究结果类似,而与印度人群中[5]特异性相差较大,这种差异可能是由于人群的不同或者选取的阴性对照不同所引起的。对于血浆非特异性 IP-10 的诊断效率,本研究结果却与文献差异较大:在国内刘训超等[7]的研究中,血浆非特异性 IP-10 对活动性结核具有较好的诊断效率,IP-10 判断活动性肺结核的曲线下面积为 0.887,敏感性和特异性分别是 83.3%、90.0%,而本研究结果为曲线下面积为 0.747,敏感性为 60.6%,特异性为 80.0%。这种差异可能是由于人群的差异或检测试剂盒等多方面的原因,也可能与选择的对照有关。在刘训超等[7]的研究中使用的是健康人群,而本研究中包含了肺部疾病。本研究结果显示,采用结核特异性 IP-10 较血浆非特异性 IP-10 提高了诊断效能。有学者认为,血浆非特异性 IP-10 可用于鉴别活动性结核病与潜伏性结核感染,而特异性 IP-10 与血浆非特异性 IP-10 均与结核危险因素相关[10],那么联合分析特异性 IP-10 与血浆非特异性 IP-10 水平能否有利于区分活动性结核与潜伏性结核,以及预测潜伏性结核的发展,尚待进一步研究。

综上所述,IP-10 是诊断结核病较好的生物标记物,有望在结核病的诊断中发挥重要作用,但若用于活动性结核病临床诊断,仍需大量的临床试验验证和统一的检测标准。

参考文献:

[1] World Health Organization. Global tuberculosis control-surveillance, planning, financing[R]. Geneva: WHO/HTM/TB/2008.393, 2008.

[2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组、全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485 - 508.

[3] 文霞, 柳爱华, 宝福凯, 等. γ-干扰素释放试验应用于结核病诊断的研究进展[J], 中国病原生物学杂志, 2011 , 6(7): 542 - 546, 552.

[4] Ruhwald M, Aabye M G, Ravn P. IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(2): 175 187.

[5] Syed-Ahamed-Kabeer B, Raman B, Thomas A, *et al*. Role of QuantiFERON-TB gold, interferon gamma inducible protein-10 and tuberculin skin test in active tuberculosis diagnosis[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9051.

[6] 王莹, 吴雪琼, 于庭. 活动性结核病患者全血干扰素诱导蛋白 10 测定及免疫状态的研究[J]. 中国实验诊断学, 2012, 16(2): 240 - 244.

[7] 刘训超, 董德琼, 杨渝浩, 等. γ 干扰素诱导蛋白 10 和巨噬细胞炎症蛋白 1α 在判断肺结核活动性中的临床意义[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(8): 584 - 587.

[8] Luster A D, Unkeless J C, Ravetch J V. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins[J]. Nature, 1985, 315(6021): 672 - 676.

[9] Walrath J, Zukowski L, Krywiak A, *et al*. Resident Th1-like effector memory cells in pulmonary recall responses to Mycobacterium tuberculosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(1): 48 - 55.

[10] Wang S, Diao N, Lu C, *et al*. Evaluation of the diagnostic potential of IP-10 and IL-2 as biomarkers for the diagnosis of active and latent tuberculosis in a BCG-vaccinated population[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51338.

(**收稿**:2013-04-18;**修回**:2013-07-23)

(编辑 邓强庭)