

潜伏性结核感染诊断方法的研究新进展

周方斌 汤冬娥 蔡晚霞

深圳市人民医院 (暨南大学第二临床医学院, 南方科技大学第一附属医院) 临床医学研究中心 广东 深圳 518020

摘要: 全球每年有近 1000 万人感染结核, 其中只有少部分人发展为活动性结核, 绝大部分表现为潜伏性结核感染 (LTBI)。研究表明高达 85%-90% 新诊断的活动性肺结核是由结核菌素试验 (TST) 阳性的 LTBI 演变而来。因此, 及时、准确地诊断和治疗 LTBI 患者是控制结核传播的最有效手段之一。本文对国内外结核潜伏感染的诊断方法及其新进展进行综述。

关键词: 潜伏性结核感染; 诊断方法; 研究进展

结核病 (Tuberculosis) 是由结核分枝杆菌复合群 (Mycobacterium Tuberculosis Complex) 感染引起的、以呼吸系统感染为主的传染性疾病¹。据估计, 全球有近 1/3 人口感染结核分枝杆菌, 2019 年, 全球有 1000 多万新发病例, 至少有 120 万人死于该病。我国仍是全球 30 个结核病高负担国家之一, 每年新发结核病患者约 80 多万例 (占 8.4%), 位居世界第三²。2014 年发表于《柳叶刀》杂志的一项基于 QuantiFERON_{TB} Gold In-Tube (GFT) 检测结果的临床研究表明, 我国总体结核潜伏感染率为 18.8%³。全球结核感染者中有超过 95% 以上表现为潜伏性结核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI), LTBI 患者如不进行相应治疗, 有 5%-10% 的风险会在其人生的某个阶段发展为活动性结核。因此, 准确及时诊断和预防性治疗潜伏性结核感染患者, 对于结核病的防控具有十分重要的意义。

目前对于 LTBI 的诊断仍缺乏统一的标准和方法, 因此, 很难在没有出现临床症状的健康人群中快速检测出 LTBI 患者。国内外诊断 LTBI 的手段主要包括结核菌素试验 (tuberculin skin test, TST) 和 干扰素释放试验 (IFN-gamma release assays, IGRAs)⁴。两者均是通过识别结核潜伏感染引起的宿主适应性免疫反应来评价结核感染情况, 但这种适应性免疫不是潜伏性结核感染所特有的⁵。此外, 其他用于 LTBI 诊断的标志物和方法也相继被报道。本文将就 LTBI 诊断方法新近的研究进展进行简要综述。

1、结核菌素试验 (TST)

一个多世纪以来, TST 是进行 LTBI 筛查的唯一手段。现行 TST 是将结核菌素的纯蛋白衍生物 (PPD) 注入人体前臂皮下, 通过测量皮肤硬结程度判定结果⁶, 一般将 PPD 强阳性或短期内从阴性转为阳性, 而无临床结核病证据者判断为结核菌潜伏感染者。虽然 TST 费用低廉, 获得广泛使用, 但由于 PPD 是一个抗原混合物, 其中有 200 多种抗原同样存在于牛结核分枝杆菌、BCG、以及一些非结核分枝杆菌菌株中, 这就造成与接种 BCG 以及感染非结核分枝杆菌的人群存在交叉反应, 从而降低了 TST 的特异度。此外, 在特殊人群中, 如慢性肾脏疾病、HIV 感染、或服用免疫抑制剂

的人群中易造成假阴性结果, 敏感性受到限制。

2、 γ 干扰素释放试验 (IGRAs)

IGRAs 是新近发展的主要通过检测特异性 IFN- γ 的释放来辅助诊断结核病或判定机体是否感染结核分枝杆菌的一种体外诊断方法。其采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或酶联免疫斑点 (ELISPOT) 法定量检出受检者全血或外周血单个核细胞对结核分枝杆菌特异性抗原的 IFN- γ 检测释放反应, 用于结核菌潜伏感染的诊断。与 TST 相反, IGRAs 检测由结核菌抗原刺激引起的 T 细胞产生的 干扰素^{7,8}。编码这些抗原的基因包括 CFP-10, ESAT-6 和 TB7.7 等, 它们存在于结核分枝杆菌的基因组, 但在牛结核分枝杆菌、BCG、以及一些非结核分枝杆菌基因组中缺失。这样, 与 TST 相比较, 在一个 BCG 接种普遍的地区, 它的特异度会显著提高。目前已商品化的 IGRAs 包括英国牛津免疫技术公司 (Oxford Immunotec) 的 T-SPOT.TB 和德国凯杰公司 (Qiagen) 的 QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (QFT)⁹。IGRAs 和 TST 仍然存在诸多缺陷: 1、敏感性仍有待提高, Diehl 等荟萃分析显示, 现有 IGRAs 和 TST 在诊断活动性结核的敏感性分别在 80% 和 70% 左右¹⁰。特别是对于免疫力低下的人群如艾滋病患者、年幼儿童等人群, 由于患者 T 细胞免疫功能的低下, 导致较多由于阳性对照反应不足而对结果无法判定 (Indeterminate), 敏感性进一步降低¹¹。2、对于 LTBI 进展为活动性结核的预测能力十分有限, 而这又是结核病得以有效预防的重要节点¹²。Rangaka MX 等对 15 项包含 26680 个临床样本的研究进行荟萃分析, 结果表明 IGRAs 和 TST 均不具有预测高危 LTBI 的能力。3、不能区分活动性结核和潜伏性结核¹³。IGRAs 只能够检测结核杆菌的感染, 对于感染的状态 (即既往感染、潜伏感染或活动状态) 无法进行区分。基于此, IGRAs 在结核病高流行区域的临床诊断中的应用受到极大地限制。因此, 开发新的结核感染期特异性的、具有预测潜能的诊断分子是解决当前 LTBI 诊断困境的主要手段。

3、其他 LTBI 诊断标志物和方法

针对 IGRAs 存在的不足, 目前主要展开以下两种改进

措施：一是增加或替换刺激 INF- γ 产生的 LTBI 期特异性的抗原。ESAT-6、CFP10 和 TB7.7 等具有高的免疫原性和特异性，但在结核潜伏感染和活动期间均分泌表达，为结核非期特异性的免疫抗原，不具备高危 LTBI 的预测能力。有研究基于抗原 T 细胞表位的生物信息学预测表明，约 80 个左右抗原可以捕获结核菌 CD4 T 细胞阳性反应的 75%¹⁴。因此，寻找新的期特异性的诊断抗原是提高敏感性、特异性和预测潜能，进行 LTBI 免疫诊断的重要手段，目前已有相关研究，其中，分泌蛋白、膜蛋白、RD 区蛋白和潜伏期蛋白等被认为是用于 LTBI 免疫诊断的重要靶目标¹⁴⁻¹⁶。二是增加检测除 INF- γ 以外的其他分子标识。研究表明，参与 Th1 免疫应答和 INF- γ 介导的信号通路的细胞因子和趋化因子，如 IL-2，TNF- α ，IP-10 等在结核感染人群中水平升高，而参与 Th2 免疫应答和一般性炎症反应的分子标识与确诊的感染不具相关性^{15,17}。但总体来说，效果并不明显¹⁸。抗原的选择依然集中在 EAST-6、CFP-10 等少数免疫显性抗原上，INF- γ 仍然是研究最广泛的细胞因子，且由于 INF- γ 的个体水平差异导致活动性结核和潜伏性结核两个阶段存在重叠，造成单纯依赖 INF- γ 检测仍旧不能对两者进行区分⁷。

结核分枝杆菌作为胞内菌，T 细胞介导的免疫反应在控制结核感染的扩散方面发挥核心作用，但是有研究表明抗体与 CD4+ T 细胞的靶点显著关联；以抗体为基础的 B 细胞能够识别结核肉芽肿集结的 B 细胞抗原表位，表明体液免疫依然具有指示结核感染进程的潜能。基于体液免疫的血清学诊断可以从多个抗原，乃至蛋白组学水平筛选潜在的潜伏感染诊断抗原。一些潜伏性相关抗原也被证实具有区分潜伏感染和活性感染及健康人群的能力¹⁹。此外，模拟结核潜伏感染的营养饥饿或缺氧模型显示结核分枝杆菌在适应潜伏期过程中相关抗原表达水平会显著上升，这从另一方面为潜在的 LTBI 诊断生物标志物的存在提供证据。因此，基于结核抗原抗体反应的 LTBI 血清学诊断依然具有重要的研究价值。

4、结语

目前对于潜伏性结核的诊断仍缺乏统一的标准和方法，现有的潜伏感染诊断手段主要包括传统的 TST 和新近发展的 IGRAs。TST 由于 PPD 中的有些抗原同样存在于牛结核分枝杆菌、卡介苗以及一些非结核分枝杆菌菌株中，造成与接种卡介苗以及感染非结核分枝杆菌的人群存在交叉反应，降低了 TST 的特异度。而 IGRAs 由于采用 RD 区蛋白，与 TST 相比较，在一个卡介苗接种普遍的地区，它的特异度会显著提高，然而，其敏感性仍有待提高，特别是在免疫抑制人群中会出现较多无法判定的结果。此外，TST 和 IGRAs 两者监测潜伏性结核向活动性结核转化的阳性预测值 (PPV) 都很低。更重要的是，两者均不能区分活动性结核和潜伏性

结核，这使得其在结核病高流行地区的临床应用中受到极大地限制。因此，鉴于现有的潜伏期结核诊断手段不能满足临床需要，迫切需要能够快速高效便宜的诊断方法从活动性结核和健康人群中鉴别和区分出潜伏性结核。许多研究人员试图用其他标志物和方法来诊断 LTBI，并取得了可喜的结果，但还需要进一步做大量的实验来证实其临床价值。

参考文献

- [1] Lawn, S. D. & Zumla, A. I. Tuberculosis. *Lancet* 378, 57-72, doi:10.1016/S0140-6736(10)62173-3 (2011).
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019. Geneva, World Health Organization, 2020.
- [3] Gao, L. et al. Latent tuberculosis infection in rural China: baseline results of a population-based, multicentre, prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 15, 310-319, doi:10.1016/S1473-3099(14)71085-0 (2015).
- [4] Munoz, L., Stagg, H. R. & Abubakar, I. Diagnosis and Management of Latent Tuberculosis Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, doi:10.1101/cshperspect.a017830 (2015).
- [5] Mack, U. et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 33, 956-973, doi:10.1183/09031936.00120908 (2009).
- [6] Huebner, R. E., Schein, M. F. & Bass, J. B., Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 17, 968-975 (1993).
- [7] 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* 146, 340-354 (2007).
- [8] Pai, M. & Menzies, D. The new IGRA and the old TST: making good use of disagreement. *Am J Respir Crit Care Med* 175, 529-531, doi:10.1164/rccm.200701-024ED (2007).
- [9] Cavusoglu, C., Yasar-Duman, M., Sezai Tasbakan, M., Isikgoz-Tasbakan, M. & Nurullah Orman, M. Evaluation of the performance of QuantiFERON(R)-TB Gold plus test in active tuberculosis patients. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 23, 100223, doi:10.1016/j.jctube.2021.100223 (2021).
- [10] Diel, R., Loddenkemper, R. & Nienhaus, A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest* 137, 952-968, doi:10.1378/chest.09-2350 (2010).
- [11] Sauzullo, I., Vullo, V. & Mastroianni, C. M. Detecting latent tuberculosis in compromised patients. *Current opinion in infectious diseases* 28, 275-282, doi:10.1097/QCO.000000000000158 (2015).
- [12] Rangaka, M. X. et al. Predictive value of interferon-

gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 12, 45-55, doi:10.1016/S1473-3099(11)70210-9 (2012).

[13] Getahun, H., Matteelli, A., Chaisson, R. E. & Raviglione, M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The New England journal of medicine* 372, 2127-2135, doi:10.1056/NEJMra1405427 (2015).

[14] Lindestam Arlehamn, C. S. et al. Memory T cells in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are directed against three antigenic islands and largely contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 subset. *PLoS Pathog* 9, e1003130, doi:10.1371/journal.ppat.1003130 (2013).

[15] Chegou, N. N. et al. Potential of novel *Mycobacterium tuberculosis* infection phase-dependent antigens in the diagnosis of TB disease in a high burden setting. *BMC Infect Dis* 12, 10, doi:10.1186/1471-2334-12-10 (2012).

[16] Meier, N. R., Jacobsen, M., Ottenhoff, T. H. M. & Ritz, N. A Systematic Review on Novel *Mycobacterium tuberculosis* Antigens and Their Discriminatory Potential for the Diagnosis of Latent and Active Tuberculosis. *Front Immunol* 9,

2476, doi:10.3389/fimmu.2018.02476 (2018).

[17] Jeong, Y. H. et al. Discrimination between active and latent tuberculosis based on ratio of antigen-specific to mitogen-induced IP-10 production. *J Clin Microbiol* 53, 504-510, doi:10.1128/JCM.02758-14 (2015).

[18] Kunnath-Velayudhan, S. & Gennaro, M. L. Immunodiagnosis of tuberculosis: a dynamic view of biomarker discovery. *Clin Microbiol Rev* 24, 792-805, doi:10.1128/CMR.00014-11 (2011).

[19] Zhou, F., Xu, X., Wu, S., Cui, X. & Pan, W. ORFeome-based identification of biomarkers for serodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* latent infection. *BMC Infect Dis* 17, 793, doi:10.1186/s12879-017-2910-y (2017).

* 基金项目：深圳市科技计划知识创新计划基础研究项目（JCYJ20170307095037263）

作者简介：周方斌，男，博士，主要从事热带传染病的诊断与疫苗研究。

通讯作者 E-mail：zhoufb_kaka@139.com