



血液結核丙型干擾素檢測 變異的影響因子及預防

■ 簡榮彥 臺大醫院

血液結核丙型干擾素檢測(interferon gamma release assays, IGRAs), 是目前用來診斷結核感染(*Mycobacterium tuberculosis* infection)的重要方法之一。IGRAs測量經由結核菌特異性抗原於體外刺激血液中T細胞釋放丙型干擾素的反應, 正日益取代結核菌素皮膚測試(tuberculin skin test, TST), 成為篩選及診斷結核感染的重要工具。目前兩個最為廣泛使用的IGRAs工具包括QuantiFERON-TB Gold In-Tube 檢驗法(QFT-GIT, Cellestis / Qiagen, Carnegie, Australia)及T-SPOT.TB檢驗法(Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom)。

然而, 許多研究陸續發現, IGRAs的檢驗結果存在相當大的變異性, 經常出現不合理的高反轉率(reversions), 亦即在連續的多次測量中, 出現不一致的結果。由於IGRAs是一種功能性測定, 於檢驗過程中, 牽涉到多個步驟, 因此檢驗結果容易

受到包括分析前, 分析中, 產品製造及免疫學的種種因素所影響。鑑於越來越廣泛的使用IGRAs, 必須仔細評估造成這些變異的因子及對IGRAs精準度的影響。

造成檢驗結果變異的因素 分析前因素

在許多造成IGRAs檢驗結果變異的因素中, 最重要的因素可能大部分來自於分析前的因素。採血的時間可能會造成檢驗結果的差異, Mazurek等學者的研究發現, 當使用QFT-GIT測定法時, 夜間(evening)收集的檢體, 較清晨(morning)收集的檢體, 較高比例呈現陽性反應。因皮膚和血液收集管橡膠蓋的消毒不足, 導致微生物污染血液樣本, 引起的免疫反應, 亦會對檢驗結果產生影響。正確的採血順序(從陰性控制管開始, 最後才採mitogen管)也很重要, mitogen汙染抗原管會造成偽陽性, 而mitogen汙染陰性控制管則會造成偽陰性的結果。



置入QFT-GIT抗原管的檢體體積也會影響檢驗的結果。雖然根據包裝說明書和過去的研究，允許使用每管0.8至1.2毫升的血液進行檢驗；但是，Gaur等學者針對0.8, 1.0 and 1.2 毫升的採血量進行研究發現，在感染結核病的患者中，採血量和陽性反應程度呈反比關係，因此導致一些偽陰性的結果。最後，劇烈搖晃QFT-GIT管可以在陰性控制管及抗原管非特異性地引起丙型肝炎干擾素釋放增加，結果可能導致偽陽性或錯誤的結果。

採血至進行細胞培養間的延遲是造成檢驗結果變異的另一個重要因素，根據產品說明書，QFT-GIT可允許長達16小時的延遲，而T-SPOT則允許長達8小時的延遲。然而，使用ELISPOT和未商業化的全血IGRAs測定法的研究發現，1至4小時的延遲就會較少分泌丙型肝炎干擾素的T細胞數量。Doberne等學者也針對延遲培養對QFT-GIT檢驗結果的影響進行研究，發

現6小時及12小時的延遲培養分別會導致19%及22%的錯誤結果。延遲培養也會降低mitogen管反應結果，而增加檢驗結果不確定(indeterminate)的比率。Jarvis等學者進一步發現，若置QFT-GIT試驗管於室溫(廠商建議)或低溫下，將降低檢體對mitogen的反應，此一結果說明了為何延遲培養會導致檢驗結果不確定的比率上升。Beffa等學者也發現，相較於春天及夏天，秋天及冬天會有較高的檢驗結果不確定發生率，顯示在低溫環境中運送檢體會產生不良的影響。

在不同的檢驗之間，T細胞接受抗原刺激的時間可能不同，根據包裝說明書，T細胞接受抗原刺激的培養時間，使用QFT-GIT時，建議介於16到24小時之間，而使用T-SPOT時，可介於16到20小時之間。雖然延長T細胞接受抗原刺激的培養時間預期能夠增加丙型肝炎干擾素的濃度及T-SPOT的反應結果，然而，Gaur等學者發現，相較於16及20小時培養時間，24小時的培養時間並無法提高結核感染患者的陽性反應率，也不會在未受感染的患者，增加偽陽性反應的比例。研究也發現，將QFT-GIT血漿儲存於4°C或-80°C四週，或儲存ELISPOT的周邊單核球於-80°C四週，並不會改變檢驗結果。



分析中因素

Metcalfe等人發現，在不同的技術員間，約有 ± 0.6 IU/mL (CV=14%)的檢驗

差異，而在初始檢驗結果落於臨界值範圍內的檢體，則會有高達 ± 0.24 IU/mL (CV=27%)的檢驗誤差，導致9%及7%的陽轉率(conversion)及反轉率(reversion)。Whitworth等人也發現，手動操作較自動操作，會產生更多檢驗結果不一致的現象。Franken 等人發現，在使用T-SPOT檢測時，不同的技術員間，陽性差異可以高達15%，然而Van Zyl-Smit等人發現，使用不同的ELISA readers進行QFT-GIT，檢驗結果並無明顯差異存在。

製造商因素

製造上的缺陷可能會導致錯誤的IGRAs結果。過去曾經發生過數次因為不良的QFT-GIT試驗管，導致大量偽陽性的事件。生產過程中的細菌污染，可能也是發生偽陽性的原因之一。在2013年，也發生過因為特定批次不良的mitogen管，造成檢驗結果不確定(indeterminate)比率大量上升之事件。

免疫因素

兩個經常導致IGRAs結果發生變異的免疫因素包括：由結核菌素皮膚測試(TST)引發的體內免疫強化(in vivo immune boosting)，及由微生物在體外引發的免疫調節反應(ex vivo immunomodulation by microbial products)。

Van Zyl-Smit等學者發現，若在進行結核菌素皮膚測試檢測三天後進行IGRA，



會明顯提高QFT-GIT 及 T-SPOT 的陽性率。此一免疫強化反應可能會使過去陰性反應的患者產生陽轉現象。目前認為造成此一免疫強化反應的機轉可能來自於結核菌素皮膚測試使用的purified protein derivative(PPD)中，所含的RD1抗原引發免疫召回(immune recall)記憶性T細胞(memory T-cells)所致。雖然免疫強化反應主要發生於受結核菌感染的患者，有些研究仍在無結核感染風險的患者身上發現在施行結核菌素皮膚測試後的IGRAs陽轉現象。目前尚不清楚此一免疫強化反應會持續多久，也不清楚不同的結核菌素皮膚測試藥物劑型是否會產生不同的免疫強化反應。

IGRAs的檢驗結果亦會受到其他內生及外生性因素所影響。微生物相關的分子模式(microbe-associated molecular patterns, MAMPs)，如peptidoglycan and



lipopolysaccharide (LPS)是引發先天及後天免疫反應的重要分子。皮膚和環境中的微生物，可能會經由採血過程進入血液檢體中，血液循環中也可發現來自腸內菌的peptidoglycan。因此，微生物及血液循環中的MAMPs，可能會影響IGRAs檢測結果，導致無法重複再現的檢驗結果。Gaur等學者發現，僅加入10 ng/ml的LPS於QFT-GIT試管中，就足以引發非特異性的陽性反應，而導致偽陽性的結果。Gaur等學者也發現，僅僅10株(forming units)的皮膚常在菌Staphylococcus aureus，就足以在6.9%來自未感染結核菌個案的QFT-GIT測試管中，引發偽陽性結果。

避免IGRAs檢驗發生變異

1. 消毒。

目前IGRAs說明書中未具體說明如何選擇消毒劑及如何於採血時進行皮膚和試管橡膠蓋消毒以減少微生物污染血液樣品的方法。因此，目前有些學者建議採用類似於血液培養的標準化方法，進行皮膚和試管橡膠蓋消毒。

2. 正確採血順序。

務必按照說明書建議的採血試管順序進行採血：(1)陰性控制管，(2)抗原管，(3)mitogen管。

3. 標準化採血體積

每隻試管的採血體積必須加以標準化，特別是抗原管。建議固定採血至試管上1毫升標記處。

4. 避免劇烈搖動試管

依照說明書的建議，採血後輕輕搖動QFT-GIT管。避免將陰性控制管和抗原管分開搖動，因為不一致的搖動，可能導致偽陽性或偽陰性的結果。

5. 避免處理延遲。

務必將採血到細胞培養間的延遲最小化。建議在採血處放置培養箱，或在檢體運送過程中使用移動式培養箱。

6. 避免分析誤差。

使用自動ELISA和ELISPOT儀器，以減少分析差異。

7. 監測製造缺陷。

持續監測陽性率和檢驗不確定(indeterminate)的發生率。當發生率持續超過預設的閾值，停止使用可能有問題的批號，並通知製造商。

8. 避免免疫強化反應。

當進行兩步驟測試程序時(先結核菌素皮膚測試，後IGRAs時)，務必在進行結核菌素皮膚測試後的72小時內，進行IGRAs採血，以避免結核菌素皮膚測試引起免疫強化反應，干擾IGRAs的檢測結果。

IGRAs是一種易於受到各種因素影響的功能性測定法，特別是當檢驗結果位於臨界值時，特別容易受到種種外在因素的干擾。雖然系統性的變異可以通過標準化及品質管控降到最低程度，還必須進一步建立代表檢驗結果無法判定的濃度範圍(indeterminate range)，以避免隨機發生的變異對IGRAs檢驗結果判讀產生錯誤的影響。