

• 检验技术与方法 •

结核感染 T 淋巴细胞斑点实验临床检测分析

张成林, 刘 杰, 张守信, 孙成铭[△]

(烟台毓璜顶医院生物芯片实验室, 山东烟台 264000)

摘 要:目的 探讨结核感染 T 淋巴细胞斑点实验(T-SPOT. TB)在临床检测结核病中的应用价值。方法 利用 T-SPOT. TB 方法检测结核疑似患者,进行科室分布分析,同时与抗酸杆菌涂片、结核抗体实验、结核分枝杆菌 DNA 检测进行对比。结果 317 例结核疑似患者中,76 例 T-SPOT. TB 阳性,阳性率 24.0%。潜伏性结核筛查科室阳性率为 9.1%~25%;肺结核及肺外结核检测诊断中,阳性率为 20.7%~66.7%。与其它实验室检测方法对比,T-SPOT. TB 方法具有明显优势。结论 T-SPOT. TB 是灵敏和特异的快速检测结核分枝杆菌感染的方法,在结核疑似患者筛查与诊断中具有较大临床应用价值。

关键词:分枝杆菌,结核; T 淋巴细胞; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)22-2749-02

结核病一直严重危害中国人民身体健康,据统计国内每年结核病患者数达一百多万。对结核分枝杆菌的快速检测是控制结核病的有效手段。传统的临床诊断结核的实验室方法有限,极易误诊漏诊^[1]。因此,发展快速敏感的检测技术十分必要。

结核感染 T 淋巴细胞斑点实验(T-SPOT. TB)是一种能够快速检测结核分枝杆菌感染的实验室检测技术,利用结核特异抗原(ESAT-6、CFP-10),通过酶联免疫斑点试验(ELISPOT)检测结核效应 T 细胞产生的 IFN- γ 。由于结核特异抗原是卡介苗(BCG)和绝大多数环境细菌所没有的,不受先卡介苗接种的影响,较结核菌素皮试(TST)更具特异性。笔者利用 T-SPOT. TB 方法检测临床标本,同时与其他结核实验室检测方法进行比较,探讨相关检测技术在临床中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对本院疑似结核患者 317 例进行 T-SPOT. TB 检测,男 150 例,女 167 例,年龄 16~88 岁。

1.2 仪器与试剂 NAPCO 6500 二氧化碳培养箱购自法国

JOUAN 公司,生物安全柜购自苏净安泰公司,T-SPOT. TB 试剂盒(Oxford,Immunotec Ltd)由上海复星公司提供。

1.3 方法 取肝素抗凝静脉血 4 mL,用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心获得外周血单个核细胞(PBMCs),与结核特异抗原(ESAT-6、CFP-10)分别加入预包被抗 γ -干扰素抗体的反应孔中,孵育过夜。PBS 洗涤,加入二抗,再次洗涤后,加入底物显色。计数显色斑点数。结果判定:当空白对照孔内斑点数低于 6 个时,任一实验孔斑点数减去空白孔斑点数大于 6 个,结果即为阳性;若空白对照孔斑点数大于 6 个,任一实验孔斑点数大于空白孔斑点数的 2 倍,结果也为阳性。

1.4 统计学处理 检测结果均用阳性率表示。数据用 SPSS16.0 软件处理。

2 结 果

2.1 T-SPOT. TB 检测结果 在全部 317 例结核疑似患者中,T-SPOT. TB 检测阳性者 76 例,阳性率为 24.0%。笔者对患者科室分布情况进行了统计,见表 1。

表 1 科室分布情况

项目	不孕不育科	风湿科	呼吸内科	胸外科	血液病科	神经内科	肾病内科	脊柱骨科	肿瘤内科	其他科室
疑似例数(n)	88	43	39	29	44	18	8	6	8	34
阳性例数(n)	20	6	20	6	4	8	3	4	2	3
阳性率(%)	22.7	14.0	51.3	20.7	9.1	44.4	37.5	66.7	25.0	8.8

2.2 不同结核检测实验结果比较 在 76 例 T-SPOT. TB 检测阳性患者中,结核抗体检测 31 例,抗酸杆菌涂片检测 38 例,结核分枝杆菌 DNA 检测 5 例,检查阳性率见表 2。

表 2 不同检测方法结果比较

项目	结核抗体	抗酸杆菌	结核分枝杆菌 DNA
检测例数(n)	31	38	5
阳性例数(n)	13	4	1
阳性率(%)	41.9	10.5	20.0

3 讨 论

目前临床对结核病的实验室检测方法主要有抗酸杆菌涂片、结核抗体及结核分枝杆菌 DNA 检测。这些检测方法在临床中存在敏感性低、特异性差、操作复杂、检测周期长等缺点,常规结核病实验室检测阳性率低于 60%。结核分枝杆菌培养是诊断结核病的金标准,培养周期需 2 个月时间,阳性率取决于采集标本中细菌的数量,不利于早期诊断和治疗。影像学检查仅对活动性肺结核诊断具有参考价值,对肺外结核诊断存在困难。因此,寻找一种敏感度高、特异度高、快速、简便的结核诊断方法成为人们研究的焦点。

[△] 通讯作者,E-mail:chenglin7654@yahoo.com.cn.

结核分枝杆菌是胞内寄生菌。人体感染后是否发病与感染细菌的数量及其毒力等因素相关,也与人体免疫功能相关。人体免疫功能包括细胞免疫和体液免疫,其中抗结核免疫主要是细胞免疫,决定细胞免疫强弱的主要是 T 淋巴细胞亚群数量及功能。结核分枝杆菌诱导细胞免疫反应,体内产生相应的致敏 T 淋巴细胞。当人体再次被结核分枝杆菌感染,致敏的 T 淋巴细胞就会迅速活化为效应 T 淋巴细胞,识别结核分枝杆菌特异性抗原并产生高水平的 IFN- γ 。因此,IFN- γ 的测定可以作为诊断结核病和潜伏性结核感染的一项指标。

T-SPOT. TB 方法能够在体外快速检测结核效应 T 淋巴细胞产生的 IFN- γ 。该方法源于 Mahairas 等^[2]在 1996 年发现的一段结核分枝杆菌特异的 RD1 基因序列,该基因不存在于卡介苗菌株和大部分环境分枝杆菌中。RD1 基因编码产生 2 种蛋白:早期分泌型抗原靶蛋白(ESAT-6)和培养滤过蛋白 10(CFP-10),作为特异性抗原刺激人体特异性效应 T 细胞产生 IFN- γ 。T-SPOT. TB 技术是分离收集结核分枝杆菌感染者外周血单个核细胞(PBMCs),PBMCs、结核特异性的抗原 A 和抗原 B(分别为 ESAT-6 和 CFP-10 部分多肽片段),与阴阳对照品加入预先包被抗体的微孔培养板进行培养。当 PBMCs 中存在结核特异性 T 淋巴细胞时,结核异性抗原刺激下分泌 IFN- γ ,抗体捕获后,加底物显色成色素斑点。每个斑点代表 1 个结核特异性 T 淋巴细胞,从而实现对结核分枝杆菌感染的辅助诊断。

基于 ESAT-6 和 CFP-10 特异抗原的 ELISPOT 实验在结核分枝杆菌感染检测中具有更高灵敏度和特异度^[3-4],以及操作快速、简便,提示它能为全球结核病的控制发挥巨大作用。该法已经在欧洲和加拿大批准使用,亦获得了美国食品药品监督管理局的批准。在某一学校的爆发流行中,该新方法的结果同结核菌素实验结果相比,与结核病暴露率更有相关性联系,这表明在隐性感染人群中 T-SPOT. TB 方法有更高的诊断灵敏度^[5]。

对于处于免疫抑制状态的患者,从潜伏性结核发展到活动性肺结核的危险性要高于普通人群^[6-7],所以正确识别那些已感染结核的患者非常重要。由于免疫抑制状态患者发展成为活动性肺结核的高风险性,对于他们而言,筛查和治疗潜伏性结核是最重要的目标^[8]。

该研究中相关科室对潜伏性结核筛查结果表明,不孕不育科筛查阳性率为 22.7%,风湿科筛查阳性率为 14.0%,血液病科为 9.1%,肿瘤内科为 25.0%。T-SPOT. TB 检测结果有利于医生对患者进行预防性用药,对防止进展为活动性肺结核具有重要意义。

在肺结核及肺外结核检测诊断中,呼吸内科阳性率为 51.3%,胸外科为 20.7%,神经内科为 44.4%,肾内科为 37.5%,脊柱骨科为 66.7%。较高的阳性率结果表明 T-SPOT. TB 方法完全能够辅助医生的临床诊断,具有较高临床价值。

在 76 例 T-SPOT. TB 阳性患者中,结核抗体阳性率为 41.9%,抗酸杆菌阳性率为 10.5%,结核分枝杆菌 DNA 阳性率为 20.0%。相对降低的阳性率结果表明,T-SPOT. TB 方法明显优于其他结核检测技术,这也与相关文献结果一致。

T-SPOT. TB 方法在结核检测临床应用中不断扩大。Dosanjh 等^[9]研究了 ELISPOT 技术在预测活动性肺结核应用方面的进展,IFN- γ 作为效应 T 淋巴细胞分泌的一种细胞因子,不但能够反映人体结核的细胞免疫情况,还与体内结核分枝杆菌的抗原含量密切相关。另外,利用 ELISPOT 技术可以在结核性关节炎、结核性腹膜炎、结核性心包炎等方面都进行相关应用研究^[10-12]。下一步笔者计划在结核检测方面进一步扩大 T-SPOT. TB 方法应用范围,充分发挥 T-SPOT. TB 方法检测优势。

参考文献

- [1] Yoon HJ, Song YG, Park WI, et al. Clinical manifestations and diagnosis of extrapulmonary tuberculosis[J]. Yonsei Med J, 2004, 45(3):453-461.
- [2] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis[J]. J Bacteriol, 1996, 178(5):1274-1282.
- [3] Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4):824-828.
- [4] Lai CC, Tan CK, Lin SH, et al. Diagnostic performance of whole-blood interferon- γ assay and enzyme-linked immunospot assay for active tuberculosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71(2):139-143.
- [5] Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in a school tuberculosis outbreak[J]. Lancet, 2003, 361(9364):1168-1173.
- [6] Haley CA, Cain KP, Yu C, et al. Risk-based screening for latent tuberculosis infection[J]. South Med J, 2008, 101(2):142-149.
- [7] Hauck FR, Neese BH, Panchal AS, et al. Identification and management of latent tuberculosis infection[J]. Am Fam Physician, 2009, 79(10):879-886.
- [8] Horsburgh CR Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States[J]. N Engl J Med, 2004, 350(20):2060-2067.
- [9] Dosanjh DP, Bakir M, Millington KA, et al. Novel M tuberculosis antigen-specific T-cells are early markers of infection and disease progression[J]. PLoS One, 2011, 6(12):e28754.
- [10] Tan CK, Lai CC, Lin SH, et al. Diagnostic utility of enzyme-linked immunospot assay for interferon- γ in a patient with tuberculous arthritis and pyomyositis[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2011, 44(5):397-400.
- [11] Cho OH, Park KH, Park SJ, et al. Rapid diagnosis of tuberculous peritonitis by T cell-based assays on peripheral blood and peritoneal fluid mononuclear cells[J]. J Infect, 2011, 62(6):462-471.
- [12] Bathoorn E, Limburg A, Bouwman JJ, et al. Diagnostic potential of an enzyme-linked immunospot assay in tuberculous pericarditis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(5):874-877.