

• 论 著 •

结核感染 T 细胞斑点试验与荧光定量 PCR 在肺外结核诊断中的应用

王成勇¹, 潘士虎¹, 刘 敏², 刘 洁², 吴 河¹

(1. 滨州市结核病防治院检验科, 结核科, 山东滨州 251700; 2. 滨州市中心医院检验科, 山东滨州 251700)

摘 要:目的 探讨结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)与荧光定量聚合酶链反应(PCR)在肺外结核病诊断中的临床应用价值。方法 肺外结核组 125 例,均进行 T-SPOT. TB、TB-PCR 和抗酸杆菌涂片检测;对照组非结核疾病患者 87 例,均进行上述检测。结果 125 例肺外结核患者,涂片抗酸杆菌阳性 4 例,阳性率 3.2%;PCR 阳性 57 例,阳性率 45.6%;T-SPOT. TB 阳性 96 例,阳性率 76.8%。T-SPOT. TB 与 TB-PCR 两种方法共检测阳性患者 104 例,阳性率 83.2%。对照组 PCR 阳性 3 例,阳性率 3.4%;T-SPOT. TB 阳性 4 例,阳性率 4.6%。结论 T-SPOT. TB 检测技术敏感性 & 特异性较高,在肺外结核病的诊断上有重要的实用价值,与 PCR 联合检测可进一步提高肺外结核的检出率。

关键词: T 细胞斑点试验; 聚合酶链反应; 结核

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.019

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)14-1998-02

Application of T-SPOT. TB and TB-PCR detection in extra pulmonary tuberculosis

Wang Chengyong¹, Pan Shihu¹, Liu Min², Liu Jie², Wu He¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 1. Department of Tuberculosis; Tuberculosis Prevention Hospital of Binzhou, Shandong 251700, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Binzhou, Shandong 251700, China)

Abstract: **Objective** To investigate the significance of T-SPOT. TB and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) in the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. **Methods** Among the 125 cases of extrapulmonary tuberculosis group, all the 125 cases were performed in accordance with the acid fast bacilli smear, TB-PCR and T-SPOT. TB detection. 87 cases of Non-tuberculosis disease group were detected. **Results** Among 125 cases of extrapulmonary tuberculosis, 4 cases were positive for acid fast bacilli smear and the positive rate was 3.2%; 57 cases were positive by TB-PCR and the positive rate was 45.6%; 96 cases were positive by T-SPOT. TB and the positive rate was 76.8%. Two methods were detected in 104 cases of positive patients, the positive rate was 83.2%. 3 cases were positive by TB-PCR and the positive rate was 3.4% in 87 cases with non tuberculosis disease group. 4 cases were positive by T-SPOT. TB and the positive rate was 4.6%. **Conclusion** Here is an important practical value in the diagnosis of T-SPOT. TB detection technology in extra pulmonary tuberculosis, and TB-PCR joint detection could further improve the detection rate of pulmonary tuberculosis.

Key words: T-SPOT. TB; polymerase chain reaction; tuberculosis

肺外结核病是发生于肺部以外的全身其他脏器结核病,其诊断是临床工作中的难点,易造成临床漏诊和误诊,寻找较理想的实验室检测方法,对提高肺外结核病检出率有重要意义。本文通过抗酸杆菌直接涂片、实时定量聚合酶链反应(PCR)与结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)等检测,对肺外结核病的实验室方法进行了探讨,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 肺外结核组:共入选 125 例,男 74 例、女 51 例,年龄 16~75 岁,均为 2013 年 2 月至 2014 年 8 月住院患者。其中结核性脑膜炎 27 例,淋巴结核 24 例,脊柱结核 17 例,胸壁结核 15 例,肾结核 20 例,结核性腹膜炎 17 例,关节结核 3 例,乳腺结核 2 例。非结核组:87 例,男 52 例,女 35 例,年龄 19~72 岁。其中包括:肺炎 37 例,支气管扩张 9 例,矽肺 3 例,特发性肺间质纤维 4 例,肺癌 34 例。

1.2 检测方法

1.2.1 涂片抗酸杆菌检查与结核菌培养 脓性或干酪性标本挑取直接涂片;脑脊液、腹腔积液、尿液等标本,离心后取沉淀涂片,采用萏尔-纳尔逊(Ziehl-Neelsen)抗酸染色法染色镜检。结核菌培养采用酸性罗氏培养基,标本经前处理后接种,具体操作按结核病诊断细菌学检验规程进行^[1]。

1.2.2 T-SPOT. TB 检测 按试剂盒操作规范进行。取患者静脉血 4 mL,肝素抗凝,分离外周血单个核细胞(PBMC),并将浓度调整至每 100 μ L 含有 25 万个细胞的标准溶液 500 μ L。每个测试标本需要微孔板 4 个孔,在阴性对照孔内加入细胞培养液 50 μ L,在阳性对照孔加入植物血凝素 50 μ L、在 2 个测试孔分别加入 EST-A-6 抗原和 CFP-10 抗原各 50 μ L。上述孔内分别加入配制的 PBMC 100 μ L,经孵育、洗涤、显色等步骤,进行结果判定。检测结果为“有反应性”,参照以下标准:空白对照孔斑点数为 0~5 个时且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数一空白对照孔斑点数 ≥ 6 ;空白对照孔斑点数为 6~10 个时且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数大于或等于 2 \times (空白对照孔斑点数)。如果上述标准不符合且阳性质控对照孔正常时检测结果为“无反应性”。试剂盒由英国 Oxoid Immunotec 公司生产,上海复星公司提供。

1.2.3 实时定量 PCR 法 脓性或干酪样标本:取 1~3 mL,置无菌管内加入 2~3 倍体积的 4% NaOH 溶液,37 $^{\circ}$ C 恒温处理 30 min,使其充分液化(无明显固状物且吸出时无拖丝现象)。取 1 mL 消化液加入到相应编号的 1.5 mL 无菌离心管中,15 000 r/min 离心 5 min。去上清液,沉淀加入无菌生理盐水 1 mL 打匀,15 000 r/min 离心 5 min;再重复洗涤一次。留

取沉淀进行 DNA 提取。以下操作按照中山大学达安基因公司提供的试剂盒说明进行,扩增用 BIORAD-CFX96 荧光定量扩增仪。体液(脑脊液、腹腔积液、尿液)标本:取 3~5 mL 于无菌管内,2 000 r/min 离心 1 min,取上清液 1 mL 加入到 1.5 mL 无菌离心管中,15 000 r/min 离心 5 min;吸去上液,留 100 μ L;再加入 1 mL,重复离心一次,去上清液留沉淀进行 DNA 提取;以下操作同上。标本当天不进行检测时,置 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱保存。阴性质控品 Ct 值大于临界阳性质控标准品 Ct 值大于强阳性质控标准品 Ct 值,则本次实验有效。否则实验无效,应检查试剂、仪器、反应条件等方面的误差。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组病例检测情况 两组病例均进行了涂片抗酸杆菌染色、PCR 和 T-SPOT. TB 检测,125 例肺外结核患者抗酸杆菌涂片阳性 4 例,阳性率 3.2%;PCR 阳性 57 例,阳性率 45.6%;T-SPOT. TB 阳性 96 例,阳性率 76.8%。T-SPOT. TB 与 PCR 比较, $\chi^2=25.62,P<0.05$;T-SPOT. TB 与涂片比较, $\chi^2=141.07,P<0.005$ 。非结核疾病组 87 例,涂片抗酸杆菌均阴性,PCR 阳性 3 例,阳性率 3.4%;T-SPOT. TB 阳性 4 例,阳性率 4.6%,见表 1。在 125 例肺外结核患者中,进行结核菌培养 33 例,阳性 8 例,阳性率 24.2%。

表 1 两组病例检测结果比较[n(%)]				
组别	n	T-SPOT. TB	PCR	涂片
肺外结核组	125	96(76.8)	57(45.6)	4(3.2)
非结核疾病组	87	4(4.6)	3(3.4)	0(0.0)

2.2 T-SPOT. TB 与 PCR 检测对照情况 肺外结核组 125 例,T-SPOT. TB 检测阳性 96 例;PCR 检测阳性 57 例,其中 8 例 T-SPOT. TB 检测阴性;两种方法共检测阳性患者 104 例,阳性率 83.2%,联合检测可提高肺外结核的检出率,见表 2。

表 2 两种检测方法对照情况			
PCR	T-SPOT. TB		合计
	阳性	阴性	
阳性	49	8	57
阴性	47	21	68
合计	96	29	125

3 讨论

结核杆菌侵入人体后,如果人体不能将其杀死,结核菌便在人体组织细胞内生长、繁殖,破坏所侵入的组织细胞而使人患结核病。除了毛发、牙齿和指甲外,人体任何组织器官都可以受到结核杆菌的侵犯而发病。肺外结核病的发病多发生在肺内初染的基础上,后经淋巴、血行或直接蔓延途径播散致肺外脏器或部位。肺外结核约占全部结核病的 10%~30%^[2],肺外结核存在于身体的许多部位,感染途径、表现症状不尽相同,患者的病情易被其他病症所掩盖,对早期诊断有很大的影响。痰结核杆菌涂片、培养是肺结核诊断的重要方法,但在肺外结核的诊断中,其作用受到限制,因肺外结核病患者合并活动肺结核较低。本组病例标本涂片抗酸杆菌检查阳性率为

3.2%,培养阳性率为 24.2%。分离培养法可直接获得菌落,便于与非结核分枝杆菌鉴别,是结核病诊断金标准^[3];但培养法耗时较长,不利于早期诊断。PCR 技术最低可检测 1 fg 纯化结核分支杆菌 DNA,相当于 1~20 个结核分支杆菌,并选用了一对结核分支杆菌特异性引物和一个结核分支杆菌特异性探针,因而有较高的敏感性和特异性。本组病例 PCR 阳性率为 45.6%,高于文献报道^[4];特异性为 96.6%,与文献报道相近^[5]。T-SPOT. TB 是应用 ELISPOT 检测经结核特异性的 RDI 区编码抗原 EAST-6 和 CFP-10 肽段库刺激后释放 r 干扰素的特异性 T 细胞数量诊断结核感染,这两种抗原具有高度特异性,在卡介苗及绝大多数非结核分枝杆菌中不存在^[6]。目前已有多个研究证实 T-SPOT. TB 诊断结核感染有很高的敏感性和特异性^[7-10],并用于结核病的鉴别诊断^[11]。本组病例 T-SPOT. TB 阳性率 76.8%,特异性为 95.4%,与崔鲂等^[12]报道相近。本组病例 T-SPOT. TB 阳性率高于 TB-PCR($P<0.05$),表明 T-SPOT. TB 检测在肺外结核的诊断中有重要的实用价值;两种方法共检测阳性患者 104 例,阳性率 83.2%,联合检测可进一步提高肺外结核的检出率。

参考文献

[1] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996,18(1):28-31.

[2] Sharma SK, Mohan A. Extrapulmonary Tuberculosis[J]. Indian J Med Res, 2004,120(3):316-353.

[3] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J], 中华结核和呼吸杂志, 2001,24(2):70-74.

[4] 王龙成,魏建华,宋广荣,等. 3 种检测方法在肺外结核诊断中价值的探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 2012,11(8):881-882.

[5] 贺晨艳,石海萍,韩莉,等. TB-PCR、Xpert MTB/RIF、T-SPOT 释放试验诊断结核感染的临床应用研究[J]. 医学信息, 2014,27(2):107-108.

[6] Nicol Mp, Pienaar D, Wod K, et al. Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10, and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring of therapy [J]. Clin Infect Dis, 2005,40(13):1301-1308.

[7] 范常龙,王微微,辛瑞敏,等. T-SPOT. TB 在快速诊断结核分枝杆菌感染中的价值[J]. 哈尔滨医药, 2014,34(3):174-177.

[8] 李婷,时代强. T 细胞斑点试验在痰涂阴肺结核中的诊断价值[J]. 中华临床感染病杂志, 2014,7(3):255-257.

[9] 刘红,黄永杰,王静,等. 结核感染 T 细胞斑点试验在疑似结核病诊断中的价值研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2014,37(3):192-195.

[10] Worth HS, Scott M, Connell DW, et al. Donges B, Lalvani A, IGR As-the gate way to T cell based TB diagnosis[J]. Methods, 2013, 61(1):52-62.

[11] 叶秋月,许文兵,刘晓清,等. T-SPOT. TB 在肺结节病与肺结核鉴别诊断中的应用价值[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(4):527-530.

[12] 崔鲂,杨玲,孟江萍,等. 结核感染 T 细胞斑点实验及结核抗体在肺外结核诊断中的临床意义[J]. 西部医学, 2014,26(1):103-107.