

virus infection[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(4):492-497.

[8] 杜晓菲, 张永宏, 马丽娜, 等. 人类免疫缺陷病毒和丙型肝炎病毒重叠感染者的临床及免疫特征[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(5):345-348.

[9] Aceijas C, Rhodes T. Global estimates of prevalence of HCV infection among injecting drug users[J]. Int J Drug Policy, 2007, 18(5):352-358.

[10] 王安绪, 贾文玲, 魏顺远. HIV 感染者重叠 HCV、HBV 及梅毒感染状况调查与分析[J]. 河南预防医学杂志, 2008, 29(4):260-

266.

[11] 罗平, 刘志华, 赵业萍. 柳州地区 HIV 感染者合并 HBV、HCV 及 TP 感染现状分析[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(9):917-918.

[12] 张敏英, 吴尊友, 柔克明, 等. 注射毒品者 AIDS/STD 感染状况及其高危行为的性别差异[J]. 中国艾滋病性病, 2006, 12(2):120-122.

(收稿日期:2015-07-16)

• 临床研究 •

# 结核感染 T 细胞斑点试验对肺外结核诊断的临床意义

田 涇<sup>1</sup>, 胡文斌<sup>2</sup>, 毛艳军<sup>1</sup>

(1. 甘肃中医药大学附属医院检验科, 甘肃兰州 730020; 2. 甘肃中医学院 2013 级硕士研究生, 甘肃兰州 730000)

**摘要:**目的 评价结核感染 T 细胞斑点试验(T-spot, TB 试验)对外周血中结核分枝杆菌检测的临床意义。方法 对 2014 年 5 月至 2015 年 5 月在甘肃中医学院附属医院治疗的疑似结核病患者及体检志愿者分成两组, 进行对照研究, 抽取外周静脉血采用 T-spot, TB 诊断试剂盒进行检测。结果 肺外结核组阳性者 38 例, 阳性率为 95%(38/40), 阴性者 2 例, 阴性率为 5%(2/40)。健康对照组 40 例, 阳性者 0 例, 阳性率为 0%(0/40), 阴性者 40 例, 阴性率为 100%(40/40)。灵敏度为 95%(38/40), 特异度为 100%(40/40)。肺外结核组阳性率大于健康对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 T-spot, TB 试验对肺外结核有高度的敏感性和特异性, 可以作为临床判断是否存在结核感染的检测筛查手段之一, 值得临床推广。

**关键词:**结核感染 T 细胞斑点试验; 肺外结核; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.054

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)01-0114-02

结核病是危及人类健康的传染病之一, 我国是仅次于印度的第 2 结核大国, 且近年有上升趋势。结核分枝杆菌可侵犯全身各个系统, 比较多见的有肺结核、骨结核、结核性胸膜炎、淋巴结核、肠结核等, 且肺外结核发病往往十分隐匿, 给临床的诊断和治疗带来了极大的困难。传统的检测方法存在许多不足, 随着基因分子生物学的发展, 更好的检测手段应运而生, 结核感染 T 细胞斑点试验是检测结核感染的最新方法。T-spot, TB 使用结核分枝杆菌特异性抗原刺激外周血单个核细胞, 通过细胞因子  $\gamma$ -干扰素的分泌检测抗原特异性 T 淋巴细胞的应答反应, 从而判断结核感染的状态, 具有良好的敏感性和特异性。现对在本院治疗的肺外结核感染患者与体检的健康志愿者进行对照研究, 拟探讨 T-spot, TB 试验对肺外结核诊断的临床意义, 现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** A 组(肺外结核组): 选取 2014 年 5 月至 2015 年 5 月在甘肃中医学院附属医院治疗的肺外结核患者共 40 例, 年龄 18~80 岁, 平均 43.3 岁, 所有患者均进行影像学检查及结核免疫学检查, 疑似结核, 其中淋巴结核 14 例、结核性胸膜炎 9 例、腰椎结核 8 例、结核性腹膜炎 7 例、支气管结核 2 例。B 组(健康对照组) 选取在本院体检的健康志愿者 40 例, 健康组均无陈旧性结核, 亦进行影像学检查及结核免疫学检查, 排除感染结核。整个过程由专门经过培训的人员负责完成并控制质量。

**1.2 实验试剂** T-SPOT, TB 试剂盒由上海复星长征医学科学有限公司提供。

### 1.3 方法

**1.3.1 淋巴细胞的提取、计数及铺板** 抽取肝素钠抗凝静脉血 5 mL, 颠倒混匀, 再加入 1640 至满, 混匀备用。于每支 15

mL 无菌离心管中加入 3 mL 淋巴细胞分离液, 将混匀的全血缓慢加入淋巴分离液上层约 10 mL, 离心机刹车档调至 2 档, 离心速度 2 400 r/min 离心 22 min, 用一次性吸管吸取白膜层至另一离心管中, 加 1640 至 10 mL, 颠倒混匀 2 次, 再次以 1 800 r/min 离心 7 min, 去掉上清液, 手工拍打沉淀, 再加入 1640 至 10 mL, 最后一次以 1 400 r/min 离心 7 min, 倒掉上清液, 每管加入 600  $\mu$ L AIM-V 培养液, 用枪吹匀细胞沉淀, 取 200  $\mu$ L 加入 EP 管中进行白细胞计数, 根据(测得白细胞数 - 2.5)  $\times$  200, 稀释所有标本数至每毫升  $2.5 \times 10^6$  个(每毫升低于  $2.5 \times 10^6$  个可能影响实验结果), 按照计算数值加入 AIM-V 培养液至各标本管中, 稀释后即可进行铺板, 每人份 4 孔, 分别加入 50  $\mu$ L 阳性对照、A 抗原、B 抗原和阴性对照, 再加入 100  $\mu$ L 稀释混匀的细胞悬液, 混匀后放入二氧化碳(CO<sub>2</sub>) 培养箱培养 18~22 h。

**1.3.2 显色** 按照每人份 8 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)用量将 PBS 10 倍浓缩液用蒸馏水稀释, 用配好的 PBS 应用液稀释酶标二抗抗体, 每人份 1  $\mu$ L 酶标二抗抗体, 200 倍稀释配成工作液。将培养板从 CO<sub>2</sub> 培养箱内取出, 甩掉孔内液体, 每孔用 PBS 洗涤 4 遍, 拍干, 每孔加入 50  $\mu$ L 酶标二抗抗体工作液, 放置 4~8  $^{\circ}$ C 冰箱内孵育 1 h, 取出后用 PBS 洗涤 4 遍, 拍干, 每孔加入 50  $\mu$ L 显色液, CO<sub>2</sub> 培养箱放置 5~7 min, 出现清晰斑点后用蒸馏水冲洗 4 遍, 拍干, 风干 5~10 min。

### 1.4 结果的判断

**1.4.1 阳性结果** (1) 空白对照孔数为 0~5 个且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数减法空白对照孔斑点数大于或等于 6; (2) 空白对照孔数为 6~10 个且(抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数  $\geq$  2)  $\times$  (空白对照孔斑点数)。

**1.4.2 阴性结果** 不符合上述阳性结果且 PHA 对照孔正常

则结果为阴性。

**1.5 统计学处理** 检验结果用例数或百分率表示,采用  $\chi^2$  检验方法,应用 SPSS21.0 进行数据分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

肺外结核组阳性者为 38 例,阳性率为 95% (38/40),阴性者为 2 例,阴性率为 5% (2/40)。健康对照组 40 例,阳性者为 0 例,阳性率为 0% (0/40),阴性者为 40 例,阴性率为 100% (40/40)。灵敏度为 95% (38/40),特异度为 100% (40/40)。肺外结核组 T 细胞反应阳性率大于健康对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**表 1 结核分枝杆菌抗原特异性 T 细胞反应频率**

组别	n	T 细胞反应频率	
		阴性	阳性
A 组	40	2(5%)	38(95%)
B 组	40	40(100%)	0(0%)

**3 讨 论**

世界卫生组织 2004 年的报告显示,结核病诊断率仅为 37%,即使在发达国家也仅有 50% 的结核病例得到细菌学确诊<sup>[1]</sup>,而肺外结核病变部位多变、症状不典型,相对于肺结核诊断难度又更大。目前,临床诊断结核的方法存在许多不足,如:结核菌素试验一直是诊断结核菌感染的重要方法,具有操作简单,成本低廉的优势,但存在特异性及敏感性较低的缺陷,在结核感染免疫力低下人群中,其敏感性降低。由于结核菌素纯蛋白的衍生物(PPD)是 200 多种蛋白的混合物,其中很多是非结核分枝杆菌(BCG)的共同抗原成分,在普通接种 BCG 的地区造成非常高的假阳性。而其他检测方法如细菌学检查作为诊断结核的金标准,其细菌培养费时一般需要 2 个月,可能延误治疗的最佳时间;抗酸染色试验检出率较低;组织病理学为有创伤性操作;影像学诊断缺乏特异性。随着基因分子生物学的研究发展,发现机体受到结核分枝杆菌感染后,引发固有免疫和获得性免疫,由于机体长期存在特异性的中央型及效应型记忆细胞,当抗原刺激机体时,这些记忆迅速活化增殖并释放  $\gamma$ -干扰素。因此,通过某种技术检测机体内经结核刺激后释放  $\gamma$ -干扰素的数量,即可推断出是否存在结核分枝杆菌感染。而 T-spot. TB 试验是检测结核感染的最新方法,它可以检测出 1/100 000~1/50 000 的外周血中单核细胞中经抗原刺激后释放细胞因子的细胞,目前已成为最敏感的检测方法<sup>[2]</sup>。大量研究表明 T-spot. TB 试验检测对肺外结核感染具有较高的敏感性和特异性。如 Kim 等<sup>[3]</sup>对疑似肺外结核患者 72 例进行前瞻性研究,结果 T-spot. TB 检测对肺外结核的敏感性为 94%,明显高于结核菌素试验(47%),其中 47 例有免疫抑制性疾病,这也是结核菌素试验阳性较低的原因之一。Dai 等<sup>[4]</sup>Meta 分析结果提示 T-spot. TB 试验敏感性和特异性分别为 88% 和 89%。王永生等<sup>[5]</sup>对其医院 26 例疑似结核性脑膜炎与 23 例无结核原发病灶的脑膜炎患者做脑脊液 T-spot. TB 试验检查,进行对照研究,结果发现其灵敏度为 88.5%,特异度为 83.3%,对诊断结核性脑膜炎有用。荣兰香等<sup>[6]</sup>对其医院 268 例疑似结核病患者进行 T-spot. TB 试验和 PPD 试验进行比较,结果发现 T-spot. TB 试验比结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)试验的敏感性和特异性要高,且假阳性率和假阴性率要低,可

为临床诊断结核病患者提供早期诊断依据。聂力平等<sup>[7]</sup>比较了 T-spot. TB 试验与结核菌素试验两种检测法,结果发现 T-spot. TB 试验的灵敏度和特异度高于结核菌素试验,且假阳性率和假阴性率低于结核菌素试验。刘珍琼等<sup>[8]</sup>研究发发现用 T-spot. TB 试验检测外周血和胸腔积液中单个核细胞结核杆菌感染有助于提高结核性胸膜炎的诊断率。而且胸腔积液中单个核细胞 T-spot. TB 试验敏感性和特异性高于外周血。采用 T-spot. TB 试验检测结核性心包积液、结核性腹膜炎、结核性胸膜炎、结核性腹水、脊柱结核、肠结核、肾结核都有相关报道且检测结果较好,特异度和灵敏度皆比其他结核杆菌检测方法要高。

本次研究结果表明 T-spot. TB 对肺外结核的诊断,其灵敏度为 95%,特异度为 100%。其中肺外结核组有 2 例检测为阴性,考虑可能与患者抗结核治疗效果有关,也有可能与个别体质有关,也可能确实未有结核感染。健康对照组选择的是没有结核病史或接触史的研究对象,检测结果全部阴性,说明 T-spot. TB 试验对肺外结核检测结果是肯定的,也有可能与此试验的样本量较小有关。本次 T-spot. TB 试验采外周静脉血检查,只能检测出是否有结核杆菌的存在,并不能定位结核病灶。在痰结核菌检测阴性、胸部 CT 诊断阴性病例中诊断意义较大<sup>[9]</sup>。所以当采血做 T-spot. TB 试验检查时发现阳性者,再结合 X 线片、CT 或痰培养检查,即可基本确定感染结核病灶的位置了。由此可见 T-spot. TB 试验静脉采血检查可用于职业暴露合并结核病的定期检测筛查,可作为临床判断是否存在结核感染的检测筛查手段之一。有利于更好地用于肺外结核的辅助诊断。所以,T-spot. TB 检测对肺外结核具有重要的临床意义,值得临床推广。

**参考文献**

- [1] 乐军,梁莉,李苏辉,等. 酶联免疫斑点试验快速诊断结核分枝杆菌感染的临床应用价值[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(11): 1005-1008.
- [2] 刘晓清,张丽帆.  $\gamma$ -干扰素释放分析 T-spot. TB 诊断结核感染中的研究进展[J]. 中国实验诊断学,2012,1(12):2065-2068.
- [3] Kim SH,Chois J,Kim HB,et al. Diagnostic usefulness of atcell based assay for extrapulmonary tuberculosis[J]. Arch Zntern Med.2007,167(20):2255-2259.
- [4] Dai Y,Feng Y,Xu R,et al. Evaluation of interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis: An updated meta-analysis[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis.2012,11(31):3127-3137.
- [5] 王永生,周航,刘简,等. T-spot. TB 试验在结核性脑膜炎诊断中的价值[J]. 中国卫生标准管理,2014,5(1):68-71.
- [6] 荣兰香,马淑红,艾清,等. T-spot. TB 试验与 PPD 试验对结核病患者诊断价值相关性比较[J]. 中国实验诊断学,2013,17(8): 1475-1476.
- [7] 聂力平,宋育明. T 细胞斑点试验与结核菌素试验检测结核病的比较[J]. 福建医药杂志,2014,36(1):80-82.
- [8] 刘珍琼,段永和,张齐龙,等. T-spot. TB 试验技术检测胸腔积液在结核性胸膜炎诊断中的应用[J]. 实验与检验医学,2013,31(4):306-308.
- [9] 陈旭君,黄溢华,崔会芳,等. 52 例结核感染 T 细胞斑点试验与痰结核菌检测及 CT 诊断肺结核病的对比观察分析[J/CD]. 中华肺部疾病杂志:电子版,2014,7(4):417-418.