

• 临床研究 •

CFP10/ESAT6 融合蛋白-ELISPOT 在肺结核病中的诊断价值

王金湖,杨剑虹,李晓红,曹季军,潘晓园
(太仓市第一人民医院检验科,江苏太仓 215400)

摘要:**目的** 探讨 CFP10/ESAT6 融合蛋白-酶联免疫斑点试验(ELISPOT)和结核菌素试验(PPD 试验)在肺结核病中的诊断价值。**方法** 应用 ELISPOT 和 PPD 试验检测 30 例结核患者、54 例非结核患者和 37 例健康者,比较两者的诊断价值。**结果** 国产试剂盒 CFP10/ESAT6 融合蛋白-ELISPOT 检测 30 例结核患者、54 例非结核患者和 37 例健康者的阳性率分别为 70.0%、18.5%和 13.5%,PPD 试验检测的阳性率分别为 60.0%、29.6%和 29.7%。在 30 例结核患者中 ELISPOT 和 PPD 试验的灵敏度分别为 70.0%和 60.0%。在 54 例非结核组和 37 个健康组中 ELISPOT 和 PPD 试验的特异性分别为 83.5%和 70.3%。**结论** 国产试剂盒 CFP10/ESAT6 融合蛋白-ELISPOT 在肺结核的诊断中具有高灵敏度和特异性。

关键词:CFP10/ESAT6 融合蛋白; 酶联免疫斑点法(ELISPOT); PPD 试验; 肺结核病

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.055 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)01-0116-02

目前结核病仍是全球性面临的传染性疾病之一,WHO 公布的 2010 年全球新增 TB 达到 880 万^[1],而国内有 5.5 亿人受结核分枝杆菌感染,其中 4 500 万为活动性结核^[2]。结核菌素试验(PPD 试验)一直被用于结核感染和活动性结核诊断的体内免疫试验,但由于 PPD 是多种抗原的混合物,受到非结核分枝杆菌和卡介苗及机体内免疫因素的影响,导致 PPD 试验诊断结核感染的特异性和灵敏度较差。

酶联免疫斑点试验(ELISPOT)通过特异的相对分子质量 6×10^3 的早期分泌性抗原靶 ESAT-6 和培养滤液蛋白 CFP10 体外刺激 T 淋巴细胞分泌 γ 干扰素,由于其特异性和灵敏度高得到广泛应用^[3-5]。本研究选用新的国产试剂盒基因工程重组 CFP10/ESAT6 融合蛋白作为刺激剂,检测健康人群、非结核病患者和确诊结核患者,回顾性分析 ELISPOT 在肺结核病诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 12 月至 2015 年 3 月,选取太仓第一人民医院收治的 45 例疑似结核病患者、120 例非结核患者及 30 例体检人群,所有受试者同时进行国产试剂盒 CFP10/ESAT6 融合蛋白 ELISPOT 和 PPD 试验,对所有受试者的临床诊断、PPD 试验及 ELISPOT 检测结果行回顾性分析。所有病例均为初治病例,无人免疫缺陷病毒感染合并感染,结核病依据中华医学会结核病学分会制定的肺结核病诊断和治疗指南进行诊断。

1.2 方法 ELISPOT:使用新鲜肝素锂或枸橼酸钠抗凝的真空采血管无菌抽取受试者外周静脉血 4~5 mL,颠倒使抗凝液和血液混匀待用。按(2~3):1 的比例将抗凝血缓缓加入到含淋巴细胞分层液的灭菌离心管中,在室温下 1 000 r/min 离心 20 min,形成分界面。吸取淋巴细胞层至灭菌离心管中,加入 250 μ L 无血清培养基重悬细胞,取 10 μ L 细胞悬液加入 40 μ L 0.4%台盼蓝,混匀后取 10 μ L 台盼蓝混合细胞液,在显微镜下计数,然后用无血清培养基配制浓度为 2.5×10^6 个/mL 的细胞悬液待用。取出结核感染 T 细胞检测国产试剂盒反应板条、特异性刺激抗原、阳性对照刺激物平衡至室温,每孔加入 100 μ L 配制好的细胞悬液。将反应板放入培养箱,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 18~20 h。将反应板取出,洗涤液洗板后每孔中加入 100 μ L 标记抗体工作液,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。再次洗涤液洗板后,每孔加入平衡至室温的显色液 50 μ L,置 37 $^{\circ}$ C 闭光显色 15 min 至斑点大小肉眼清晰可见。

当阴性孔斑点数小于 13 个,检测孔斑点数减去阴性对照孔斑点数大于或等于 16 个,可判断所检测标本为阳性;当阴性

对照孔斑点数大于或等于 13 个且小于或等于 20 个,检测孔斑点数为阴性对照孔 2 倍,可判断所检测标本为阳性。

PPD 试验:选择患者前臂屈侧上 1/3 与中 1/3 交界处为注射部位,皮内注射 0.1 mL 结核菌素纯蛋白衍生物,72 h 后观察结果,测量硬结直径,若硬结直径大于或等于 5 mm,判定为阳性。

1.3 统计学处理 使用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析。计数资料以率表示,进行 χ^2 检验,检验两种诊断方法的吻合程度运用 K 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床诊断 回顾性病例分析受试者诊断结果。结核组:男 23 例,女 7 例,平均年龄(55.2 $\pm$ 23.5)岁,其中肺结核 21 例,结核性腹膜炎 3 例,结核性胸膜炎 5 例,淋巴结核 1 例。非结核组:男 28 例,女 26 例,平均年龄(57.9 $\pm$ 20.6)岁,其中肺炎 19 例,支气管哮喘 10 例,慢性阻塞性肺病 9 例,呼吸衰竭 5 例,糖尿病 5 例,帕金森氏病 3 例,肺恶性肿瘤 3 例。健康组:男 20 例,女 17 例,平均年龄(59.2 $\pm$ 18.1)岁。

表 1 ELISPOT 与 PPD 试验检测阳性结果[n(%)]

组别	n	方法	
		PPD 试验	ELISPOT
结核组	30	18 (60.0)	21 (70.0)
非结核组	54	16 (29.6)	10 (18.5)
健康组	37	11 (29.7)	5 (13.5)

表 2 结核组 ELISPOT 与 PPD 试验检测结果比较(n)

ELISPOT	PPD 试验		合计
	阳性	阴性	
阳性	15	6	21
阴性	3	6	9
合计	18	12	30

2.2 ELISPOT 与 PPD 试验灵敏度、特异性、诊断价值比较结果 ELISPOT 检测 30 例结核病患者、54 例非结核病患者和 37 例健康者的阳性率分别为 70.0%、18.5%和 13.5%,PPD 试验检测的阳性率分别为 60.0%、29.6%和 29.7%(表 1)。3 组阳性率经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2=8.8,P<0.05$)。将 30 例结核患者的 ELISPOT 与 PPD 试验检测结果进行四

格表 χ^2 检验, 两组检测结果差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.44$, $P > 0.05$, 见表 2)。将 54 例非结核病患者和 37 例健康者的 ELISPOT 与 PPD 试验检测结果进行四格表 χ^2 检验, 两组检测结果差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.53$, $P < 0.05$, 见表 3)。

表 3 非结核病组及健康组 ELISPOT 与 PPD 试验检测结果比较 (n)

ELISPOT	PPD 试验		合计
	阳性	阴性	
阳性	9	6	15
阴性	17	59	76
合计	26	65	91

3 讨 论

γ 干扰素释放分析试验是近十年来体外免疫试验在结核诊断领域的成功应用^[3-5]。而本研究选用的国产试剂, 其选用的结核分枝杆菌特异性刺激抗原为基因工程重组 CFP10/ESAT-6 融合抗原。Wu^[6]等评估了 CFP10/ESAT-6 融合抗原的 ELISPOT 试验对结核病患者和健康人群的诊断价值, 其特异性为 95.5%, 肺结核敏感性为 60.8%, 肺外结核敏感性为 33.3%。

本研究结合 CFP10/ESAT-6 融合抗原的 ELISPOT 和 PPD 试验, 对 121 例受试者进行比较性分析显示。临床回顾性分析, 121 例受试者包括 30 例结核病患者、54 例非结核病患者和 37 例健康者。本研究结核病组中 ELISPOT 和 PPD 试验的阳性率分别为 70.0% 和 60.0%, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而非结核病组和健康组中 ELISPOT 和 PPD 试验的特异性分别为 83.5% 和 70.3%, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明 CFP10/ESAT-6 融合抗原的 ELISPOT 对结核病的诊断具有更高的临床价值, 尤其是在排除诊断方面。

有报道指出, 进口的 Oxford T 细胞斑点试验 (T-SPOT) 的灵敏度和特异性分别为 90% 和 77%^[7]。本研究 CFP10/ESAT-6 融合抗原的 ELISPOT 检验特异性 (83.5%) 高于进口的

• 临床研究 •

T-SPOT (77%), 这可能与 ELISPOT 阈值的设置提高有密切关系, 其特异性得到明显上升, 可区分潜伏性结核分枝杆菌感染^[6]。

综上所述, 在肺结核诊断中, CFP10/ESAT-6 融合抗原的 ELISPOT 灵敏度明显高于传统的 PPD 试验, 且特异性更高, 更快速, 可以进行高通量筛选。因此, CFP10/ESAT-6 融合抗原的 ELISPOT 是良好的辅助诊断结核病的方法, 值得推广应用。

参考文献

[1] WHO. Global tuberculosis control[M/OL]. Geneva, Switzerland: WHO. 2011-10-04[2015-11-10], http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf.
[2] Duanmu H. Report on the 4th national epidemiological sampling survey of tuberculosis[J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2002, 25(1): 3-7.
[3] Kim CH, Kim JY, Hwang YI, et al. Interferon- γ enzyme-linked immunospot assay in patients with tuberculosis and healthy adults [J]. Tuberc Respir Dis, 2014, 76(1): 23-29.
[4] O'Shea MK, Fletcher TE, Beeching NJ, et al. Tuberculin skin testing and treatment modulates interferon-gamma release assay results for latent tuberculosis in migrants[J]. PLoS One, 2014, 9: e97366.
[5] Vassilopoulos D, Tsikrika S, Hatzara C, et al. Comparison of two gamma interferon release assays and tuberculin skin testing for tuberculosis screening in a cohort of patients with rheumatic diseases starting anti-tumor necrosis factor therapy[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(20): 2102-2108.
[6] Wu X, Li Q, Liang Y, et al. Clinical Evaluation of a Homemade Enzyme-Linked Immunospot Assay for the Diagnosis of Active Tuberculosis in China[J]. Mol Biotechnol, 2011, 47(1): 18-25.
[7] Keyser E, Keyser F, and Baets F. Tuberculin skin test versus interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis infection[J]. Acta Clin Belg, 2014, 69(3): 358-366.

(收稿日期: 2015-01-28)

胆道感染患者 387 株胆汁分离菌耐药性分析

吕金城

(曲靖市第二人民医院检验科, 云南曲靖 655000)

摘要:目的 探讨该院胆道感染患者胆汁标本病原菌分布及耐药性, 为临床合理用药提供实验室依据。方法 从胆道感染患者胆汁标本中分离病原菌 387 株, 采用 K-B 纸片法和法国梅里埃 VITEK-2 系统进行鉴定及药敏试验; 结果判定按照美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 标准; 全国和云南省的相关数据采用该院参加全国耐药监测网 (CHINET) 中胆汁标本分离菌的数据进行统计分析。结果 该院胆道感染患者感染比例最高的病原菌依次为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌和屎肠球菌, 与 2013 年 CHINET 胆汁标本中显示的全国和云南省排名前 4 位的病原菌一致。大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌除对碳青霉烯类、阿米卡星、头孢吡肟、阿莫西林/克拉维酸较敏感外, 对其余抗菌药物均有较高的耐药性, 且耐药率略高于全国和云南省平均水平; 粪肠球菌和屎肠球菌对红霉素、四环素、奎奴普丁/达福普汀、青霉素 G 具有较高的耐药率, 对其余抗菌药物均较敏感; 其敏感性均高于全国和云南省平均水平。结论 该院胆道感染患者感染的主要病原菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌和屎肠球菌。临床医生可首选碳青霉烯类、阿米卡星、头孢吡肟、阿莫西林/克拉维酸、万古霉素、利奈唑胺、喹诺酮类抗菌药物对患者进行经验治疗。

关键词:胆道疾病; 感染; 药物耐受性; 病原菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.056 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2016)01-0117-03

胆道系统由于生理部位的特殊性, 其感染患者的治疗也成为临床较棘手的问题。近年来由于抗菌药物大量及不合理应