

• 论 著 •

4 种检测方法在结核病临床诊断中的应用价值^{*}

喻 容, 胡发莉, 石国民, 彭雪峰, 马小华, 石 燕, 聂 英, 陈拥军, 吴佳玲, 向延根

(长沙市中心医院检验科, 湖南长沙 410006)

摘 要:目的 探讨结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT, TB)、结核分枝杆菌快速培养试验、结核分枝杆菌抗体免疫球蛋白 M(IgM)与免疫球蛋白 G(IgG)联合检测,以及痰液或肺泡灌洗液涂片 4 种肺结核诊断方法的临床诊断价值。**方法** 选取该院 2014 年 10 月至 2015 年 5 月临床初次诊断为结核病,且尚未用药的住院患者 516 例,对所有患者行 T-SPOT, TB、结核分枝杆菌快速培养试验、结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测和痰液或肺泡灌洗液涂片检测,计算并比较各方法的灵敏度。**结果** T-SPOT, TB 的灵敏度(88.76%)高于结核分枝杆菌快速培养试验(45.74%)、结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测(72.87%)、痰液或肺泡灌洗液涂片(17.25%),差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** T-SPOT, TB 在检测结核分枝杆菌感染、辅助结核病诊断方面具有很高的应用价值,同时联合其他检测方法可提高诊断率,满足不同的临床需要。

关键词:肺结核; 结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验; 结核分枝杆菌抗体; 结核分枝杆菌快速培养试验; 痰液或肺泡灌洗液涂片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0580-03

The application value of four detection methods in clinical diagnosis of tuberculosis^{*}

Yu Rong, Hu Fali, Shi Guomin, Peng Xuefeng, Ma Xiaohua, Shi Yan, Nie Ying, Chen Yongjun, Wu Jialing, Xiang Yangen

(Department of Clinical Laboratory, Changsha Central Hospital, Changsha, Hu'nan 410006, China)

Abstract: Objective To explore the clinical diagnostic value of four kinds of diagnostic methods, including pulmonary tuberculosis, including T-cell-based spot test for tuberculosis infection(T-SPOT, TB), rapid culture test for Mycobacterium tuberculosis, combined detection of IgM and IgG antibodies in tuberculosis and sputum or bronchoalveolar lavage fluid smear. **Methods** A total of 516 cases of patients who were initially diagnosed with tuberculosis and without medication were collected from October 2014 to May 2015 in this hospital. T-SPOT, TB, rapid culture test for Mycobacterium tuberculosis, combined detection of IgM and IgG antibodies in tuberculosis and sputum or bronchoalveolar lavage fluid smear were performed in all patients. The sensitivity of these methods were calculated and compared. **Results** The sensitivity of T-SPOT, TB(88.76%) was higher than that of rapid culture test for Mycobacterium tuberculosis(45.74%), combined detection of IgM and IgG antibodies in tuberculosis(72.87%) and sputum or bronchoalveolar lavage fluid smear(17.25%), all had statistically significant differences($P < 0.01$). **Conclusion** T-SPOT, TB might have significant application value for detecting Mycobacterium tuberculosis infection and assisting the diagnosis of tuberculosis. Meanwhile, combining with other detection methods could greatly improve the diagnostic rate and meet different clinical needs.

Key words: pulmonary tuberculosis; T-cell-based spot test for tuberculosis infection; tuberculosis antibody; rapid culture test for Mycobacterium tuberculosis; sputum or bronchoalveolar lavage fluid smear

肺结核是一种由结核分枝杆菌感染引起,严重危害人类健康的慢性传染病。目前全世界活动性肺结核患者达 2 000 万人,每年死于结核病的患者人数达 200~300 万人^[1-2]。我国活动性肺结核患者约有 450 万人,年均死亡约 13 万人^[3-4],传统的罗氏培养法虽然仍被视为“金标准”,但其灵敏度不高且耗时长,不能满足临床快速诊断的需要,因此,为弥补罗氏培养法的缺点,采用快速准确的检测方法对防治结核分枝杆菌感染极为重要^[5]。目前,针对结核分枝杆菌的快速检测方法有多种。(1)影像学检查,如 X 射线、CT 等。(2)病理学检查,如对病灶进行组织切片。(3)实验室检查:免疫学检查,如酶联免疫吸附试验(ELISA)、胶体金法等;微生物学检查,该方法是诊断结核分枝杆菌感染的金标准,包括直接涂片查找抗酸杆菌和结核分枝杆菌快速培养;分子生物学检查,包括核酸分子杂交和聚合酶链式反应(PCR)等;以及结核分枝杆菌感染 T 细胞检测等^[6]。本研究采用结核分枝杆菌抗体检测、结核分枝杆菌快速培养试验、痰液或肺泡灌洗液涂片检测和结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT, TB),现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 10 月至 2015 年 5 月本院收治的临床初次诊断为结核病且尚未用药的住院患者 516 例,男 398 例,女 118 例;年龄 19~78 岁,平均(44.50±6.68)岁。结核病患者纳入标准:(1)患者具有长期低热、咳嗽、咳痰、咯血、消瘦、乏力等典型症状,胸部 CT 提示明显肺结核征象;(2)行支气管镜肺泡灌洗,灌洗液内找到抗酸杆菌,或病理显微镜检查证实具有肺结核改变,或痰涂片检查显示抗酸杆菌阳性至少 1 次,或结核分枝杆菌快速培养阳性;(3)患者胸腔积液穿刺检查,穿刺液为渗出液,穿刺液标本检查可见大量淋巴细胞,腺苷脱氨酶大于 45 U/L^[7]。

1.2 方法 对所有患者分别进行 T-SPOT, TB、结核分枝杆菌快速培养试验、结核分枝杆菌抗体检测和痰液或肺泡灌洗液涂片检测。

1.2.1 T-SPOT, TB 使用上海复星长征医学科学有限公司提供的 T-SPOT, TB 试剂盒,按照说明书进行操作。采集每例患者 5 mL 肝素抗凝血,加入 Ficoll 淋巴分离液后,经过离心,

^{*} 基金项目:艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项资助项目(2013ZX10005004)。 作者简介:喻容,男,主管检验技师,主要从事临床微生物学与检验研究。

洗涤得到外周单核细胞并进行细胞计数板显微镜计数,若每个大方格单核细胞数超过 55 个则需进行细胞稀释,若低于 35 视为不合格标本,需重新抽血,最后通过放大镜进行斑点计数。结果判断标准:(1)空白对照孔点数为 0~5,总检测孔数与空白对照孔数的差值大于或等于 6,则检测标本判为阳性;(2)空白对照孔点数大于或等于 6,总检测孔数是空白对照孔点数的 2 倍,则检测标本判为阳性。

1.2.2 结核分枝杆菌抗体检测试验 分别采用潍坊市康华生物技术有限公司生产的结核分枝杆菌免疫球蛋白 G(IgG)及免疫球蛋白 M(IgM)抗体胶体金检测试剂盒和结核分枝杆菌抗体酶联免疫法检测试剂盒对患者血清标本进行检测,具体检测方法 & 判断标准参照试剂盒说明。

1.2.3 结核分枝杆菌快速培养试验 将 24 h 痰液标本用 2% N-乙酰-L-半胱氨酸-氢氧化钠(NALC-NaOH)消化液前处理(左旋半胱氨酸临用时配制),采用碱消化方式。视标本性状,加 1~2 倍体积的处理液于无菌痰杯中,使痰液充分液化,整个处理时间不超过 20 min,再振荡均匀并加入 pH7.0 的生理盐水至 35 mL 处,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,加生理盐水 1 mL 溶解后接种到液体分枝杆菌培养管(MGIT),再放入美国 BD 公司生产的 BACTEC MGIT 960 全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏仪,具体操作方法参照仪器手册。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理与统计分析,计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行统计学分析, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

T-SPOT. TB 的灵敏度明显高于结核分枝杆菌抗体 IgG 与 IgM 联合检测、痰液及肺泡灌洗液涂片检测和结核分枝杆菌快速培养试验,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 102.274、8.718、32.979, $P<0.01$)。结核分枝杆菌快速培养试验的灵敏度低于结核抗体 IgG 与 IgM 联合检测,高于痰液或肺泡灌洗液涂片,差异均有统计学意义(χ^2 值分别为 137.633、60.647, $P<0.01$)。结核分枝杆菌抗体 IgG 与 IgM 联合检测的灵敏度高于痰液或肺泡灌洗液涂片,差异有统计学意义($\chi^2=13.081, P<0.01$)。见表 1。

表 1 4 种方法检测灵敏度比较($n=516$)

检测方法	阳性例数(n)	灵敏度(%)
T-SPOT. TB	458	88.76
结核分枝杆菌快速培养试验	236	45.74*
结核分枝杆菌抗体 IgG 与 IgM 联合检测	347	72.87*#
痰液或肺泡灌洗液涂片	89	17.25*#△

*: $P<0.01$, 与 T-SPOT. TB 比较; #: $P<0.01$, 与结核分枝杆菌快速培养试验比较; △: $P<0.01$, 与结核分枝杆菌抗体 IgG 与 IgM 联合检测比较。

3 讨 论

结核病是目前世界上首要的感染性疾病,是全球关注的公共卫生和社会问题之一。我国是结核病高负担、高危险性的国家^[8],因此,早期诊断是结核病早期治疗和预防传播的重要手段之一,其中实验室检查对结核病辅助诊断起着举足轻重的作用。

T-SPOT. TB 技术是近几年新研发的结核病诊断技术,其基于 PCR 技术,从单细胞水平对具有分析抗体或细胞因子功能的细胞极性进行检测。无论患者是否出现症状或症状是否典型,都能通过检测效应 T 淋巴细胞的水平来确定是否有结核分枝杆菌感染,具有较高的灵敏度^[8]。本研究 T-SPOT. TB 检测的灵敏度为 88.76%,与朱国勇^[9]报道的 83.33%和国外

文献^[8,10-12]报道的 83%~100%基本相符。本研究发现,在 516 例肺结核患者中有 109 例患者 T-SPOT. TB 检测阳性,其余 3 种方法检测均为阴性,这说明在其他 3 种检测方法不能检出肺结核感染时,T-SPOT. TB 对结核感染仍具有显著的诊断价值。另外,在 236 例结核分枝杆菌快速培养试验阳性患者中,有 230 例 T-SPOT. TB 也是阳性,这可以说明 T-SPOT. TB 与“金标准”检测有很好的-致性。但结核分枝杆菌快速培养试验具有操作繁琐,需要体外预处理及专门培训技术人员,成本高,且只能用于检测是否有结核感染,并不能鉴别活动性肺结核和结核潜伏感染等缺点,这都限制了其在临床的推广和应用。我国结核病发病率高,隐匿性结核多,这削弱了 T-SPOT. TB 在诊断活动性肺结核时的特异性^[13]。但是该法检测所需时间不长,24 h 即可出结果,而且能检测出隐匿性结核,可实现疾病的早发现、早治疗,因此可将其列入体检项目。总之,由于 T-SPOT. TB 技术具有抗原的高特异性、试验方法学的高灵敏度等突出优点,使其在检测结核分枝杆菌感染及辅助结核病诊断方面具有很高的应用价值。目前,世界各国的实验室及临床科室都在大量应用此项技术。

痰液或肺泡灌洗液涂片检测是一项较为简单的微生物形态学检验技术,操作简便、快速、价格便宜和特异性强,一旦涂片阳性,即可确诊为结核分枝杆菌感染。因此,目前仍是基层医院作为初筛及诊断结核病的主要检测手段,本次研究中痰液或肺泡灌洗液涂片抗酸染色的灵敏度为 17.25%,与文献^[14-15]报道的 13.85%~22.90%相符;而与杨松等^[16]报道的 36.4%相差较大,这可能是由于本研究样本量(516 例)明显高于文献^[16]报道的 98 例,以及标本未正确留取等因素降低了阳性率。但此方法灵敏度太低,在本研究中位居 4 项检查最末尾,对潜伏性结核的筛查意义不大。本次研究发现在 516 例肺结核患者中,有 15 例涂片阳性而培养为阴性,可能是由于标本的运送或不规范采集等造成结核分枝杆菌活力低下。因此,必须严格实行全面的质量管理,按照标准操作手册进行操作,以提高其阳性检出率。

利用 BACTEC MGIT 960 系统进行结核分枝杆菌快速生长培养检测,该系统是集分枝杆菌快速生长培养、检测及药敏技术为一体的全自动分枝杆菌培养仪,通过连续检测接种标本的培养基所显示的荧光强度的变化判断是否有分枝杆菌生长^[17-18]。本研究中结核分枝杆菌快速培养试验的灵敏度为 45.74%,与马俊等^[19]报道的 46.5%相近,但低于文献^[20]报道的 70.05%,原因可能为本研究样本量为 516 例明显高于文献^[20]报道的 180 例。此外,操作不规范及破坏了细胞完整性等因素也可能降低其灵敏度。本研究还发现在 516 例肺结核患者中,有 162 例结核分枝杆菌快速培养阳性,而痰液或肺泡灌洗液涂片阴性,说明结核分枝杆菌快速培养的阳性检测率明显高于痰液或肺泡灌洗液涂片。结核分枝杆菌快速生长培养作为诊断结核分枝杆菌感染的金标准,是目前常用的结核分枝杆菌培养系统,该系统可对多种标本进行结核分枝杆菌培养,一经发现阳性即可通知临床,因其有活菌,必要时可立即加做药敏试验,可大大缩短报告时间^[21]。但该方法也存在缺陷,如培养周期长,灵敏度低,不能排除潜伏期结核菌感染的影响,造成特异度也有所降低^[22]。

结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 分别利用 ELISA 和胶体金法进行检测,两者联合检测是一种简便、快速的血清学检测方法,且有较高的灵敏度。本研究中结核抗体 IgM 与 IgG 联合检测的灵敏度(72.87%)与相关研究报道的 96.88%相差较大^[23],这可能与本研究样本量(516 例)明显高于文献报道的 160 例有关。此外,本研究发现在 516 例肺结核患者中,有 45 例结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测阳性,而其余 3 种

方法检测阴性,说明结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测对 T-SPOT. TB、结核分枝杆菌快速培养和痰液或肺泡灌洗液涂片检测结核分枝杆菌感染阴性患者的诊断具有重要意义。因此,结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测可以减少漏诊,做到早发现、早治疗。

综上所述,肺结核实验室快速诊断技术已经取得了较大进展,其中近几年研发的 T-SPOT. TB 诊断肺结核的阳性率、灵敏度均较高,可见 T-SPOT. TB 在检测结核分枝杆菌感染、辅助结核病诊断方面具有很高的应用价值,值得临床推广。如今随着医疗设施的不断改进,单一的检测方法已不能满足辅助临床诊断肺结核的需要。因此,采用快速、简便、灵敏度高的检测方法对结核病的辅助诊断尤为重要,并且同时联合运用 T-SPOT. TB、结核分枝杆菌快速培养试验、结核分枝杆菌抗体 IgM 与 IgG 联合检测和痰液或肺泡灌洗液涂片可大大提高诊断率,并满足不同临床需要,为结核病的临床诊断与防治提供科学依据。

参考文献

[1] 沈玉祯. 结核病实验室诊断技术[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2013, 34(4):563-565.

[2] 江渊,王曲直,张阳奕,等. 快速检测技术在奶牛结核病检测中的应用研究[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(6):447-452.

[3] Su WT. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2002, 35(4):209-214.

[4] 杨洪毅,石洁,刘国栋,等. 荧光定量 PCR 技术在痰结核菌检测中的应用[J]. 现代预防医学, 2013, 40(8):1483-1484.

[5] 吴文旺,王峻. 结核病实验室快速诊断[J]. 旅行医学科学, 2005, 11(2):40-42.

[6] 吴第梅,阳萍. 结核病检查方法的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1):106-107.

[7] Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2010, 28(4):245-252.

[8] Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle all old enemy[J]. Chest, 2007, 131(6):1898-1906.

[9] 朱国勇. 结核感染 T 细胞斑点试验诊断肺结核临床价值探讨[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(14):1822-1825.

[10] Dominguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvão M, et al. Compar-

ison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(1):168-171.

[11] Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(3):322-328.

[12] Dosanjh DP, Hinks TS, Innes JA, et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis[J]. Ann Intern Med, 2008, 148(5):325-336.

[13] 谢希,陈进伟,高洁生,等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核诊断中的应用[J]. 临床内科杂志, 2010, 27(6):396-399.

[14] 郭小微. 3 种方法检测结核分枝杆菌的比较[J]. 重庆医学, 2005, 34(10):1506-1507.

[15] 廖传玉,蒋克珉,高万. 痰分枝杆菌快速培养和药敏试验的评价[J]. 临床肺科杂志, 2005, 10(1):115.

[16] 杨松,张耀亭,林素梅,等. 抗酸染色对肺结核的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(4):328-329.

[17] 张培元,康丽君. BACTEC-460-TB 临床标本检测分析[J]. 中国防痨杂志, 1993, 15(4):164-165.

[18] Anargyros P, Astill DS, Lim IS. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6):1288-1291.

[19] 马俊,王自立. 结核分枝杆菌快速培养的研究进展及其临床意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(5):388-390.

[20] 王馨. 结核菌快速培养法 γ -干扰素释放试验在结核病诊断中的应用价值[J]. 安徽医学, 2015, 36(5):607-609.

[21] Vinton P, Mhrshahi SP, Jenkin G, et al. Comparison of QuantiFERON-TB Gold In-Tube test and tuberculin skin test for identification of latent Mycobacterium tuberculosis infection in health-care staff and association between positive test results and known risk factors for infection [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009, 30(3):215-221.

[22] 陈献雄,杨倩婷,徐六妹,等. 采用干扰素释放反应试验和 PPD 皮试对深圳市高校学生结核分枝杆菌潜伏感染筛查的研究[J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(6):737-738.

[23] 古翠姣,白广红. 结核抗体 IgG 与 IgM 联合检测在结核病诊断中的应用价值[J]. 吉林医学, 2013, 34(29):6004-6005.

(收稿日期:2015-12-14)

(上接第 579 页)

of taranto: vibrio biodiversity in ecotoxicology approach[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2014, 21(3):2378-2385.

[11] Ma C, Deng XL, Ke CW, et al. Epidemiology and etiology characteristics of foodborne outbreaks caused by vibrio parahaemolyticus during 2008–2010 in Guangdong province, China[J]. Foodborne Pathog Dis, 2014, 11(1):21-29.

[12] Haenen OL, van Zanten E, Jansen R, et al. Vibrio vulnificus outbreaks in Dutch eel farms since 1996: strain diversity and impact [J]. Dis Aquat Organ, 2014, 108(3):201-209.

[13] Torres C, Vitalis EA, Baker BR, et al. LAVA: an open-source approach to designing LAMP(loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(2):1-7.

[14] Dhama K, Karthik K, Chakraborty S, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review[J]. Pak J Biol Sci, 2014, 17(2):151-166.

[15] Goto M, Honda E, Ogura A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaph-

thol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3):167-172.

[16] Zong XJ, Wang WW, Wei HR, et al. Rapid detection of Prunus necrotic ringspot virus using magnetic nanoparticle-assisted reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. J Virol Methods, 2014(208):85-89.

[17] Fischbach J, Xander NC, Frohme MA. Shining a light on LAMP assays-A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine[J]. Biotechniques, 2015, 58(4):189-194.

[18] Nose K, Nagamine K, Tokuda J, et al. Polyethylene glycol accelerates loop-mediated isothermal amplification(LAMP) reaction[J]. Yakugaku Zasshi, 2013, 133(10):1121-1126.

(收稿日期:2015-11-26)

