

结核感染 T 细胞斑点试验在结核性胸膜炎中的诊断价值

万 荣, 李明武, 赖明红, 朱惠琼
(昆明市第三人民医院结核二内科, 云南 昆明 650041)

[关键词] 分枝杆菌; 结核; 结核菌素试验; 结核分枝杆菌抗体; 酶联免疫斑点检测; 胸膜炎
[中图分类号] R521.7 [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2013) 09-0134-03

结核性胸膜炎是结核菌由近胸膜的原发病灶直接侵入胸膜, 或经淋巴管血行播散至胸膜而引起的渗出性炎症。结核性胸膜炎是内科常见的疾病, 其诊断可根据临床表现、胸水常规生化、胸水腺苷脱氨酶 (ADA)、胸水抗酸杆菌涂片或胸水结核菌培养、胸水 TB-DNA 及 T-SPOT.TB 检测。笔者对患者采用 T-SPOT.TB 检测、胸水 TB-DNA、结核抗体 (TB-DOT/TB-CK)、结核菌素试验 (PPD), 对结核性胸膜炎的诊断的特异性、敏感性进行研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

昆明市第三人民医院结核二科 2010 年 11 月至 2012 年 3 月收治的胸腔积液患者为研究对象。依据其发热、胸痛、胸闷等临床表现、影像学检查以及结核菌等相关检查证实结核性胸膜炎患者 150 例, 男性 95 例, 女性 55 例, 年龄 6~80 岁, 平均 (34.48 ± 17.18) 岁。非结核引起的渗出性胸腔积液的 36 例患者为对照组, 男性 23 例, 女性 13 例, 年龄 11~77 岁, 平均 (50.94 ± 18.14) 岁。对照组中有 6 例为恶性胸腔积液 (5 例肺癌, 1 例白血病), 28 例为肺炎引发的渗出性胸腔积液, 1 例胸腔积液与肺间质纤维化有关, 1 例与自身免疫性溶血有关。

1.2 仪器和试剂

Baker 生物安全柜, RIVCO CO₂ 孵育箱。T-SPOT.TB 试剂盒 (英国 Oxford Immunotec Ltd.), 淋巴细胞分离液、AIMV、RPMI1640 由上海长征复星公司提供。PPD 试剂由成都生物制品研究所提供。结核分枝杆菌抗体诊断试剂盒 (TB-DOT 胶体金法) 由上海奥普生物医药部公司, 结核杆菌

检测试剂盒 TB-CHECK-1 (TB-CK) 法国埃乐莱特珊达柯斯公司提供。TB PCR 荧光检测试剂盒, TB 阳性定量参考品, 购于中山大学达安基因股份有限公司; DA7600 型实时荧光定量 PCR 仪为中山大学达安基因股份有限公司生产。

1.3 T-SPOT.TB 检测方法

采集外周静脉血 4 mL, 肝素抗凝, 分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mono-nuclear cells, PBMCs), 用细胞培养基 AIMV 重悬细胞, 并将浓度调整至 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。在已包被抗 IFN γ 单抗的 96 孔板上, 分别加入 50 μL 细胞培养基作为空白对照, 50 μL 植物血凝素作为阳性对照, 以 50 μL 结核分枝杆菌特异性 ESAT-6 和 CFP-10 作为刺激原。然后在每个孔中加入 100 μL 上述细胞悬液。把 96 孔板放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养 16~20 h 后, 用 PBS 液洗板 4 次, 加入碱性磷酸酶标记的二抗, 在 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h。孵育后再用 PBS 液洗板 4 次。最后每孔加入显色底物 BCIP/NBTPLUS, 室温中静置 7 min 后去离子水终止反应。阳性结果判断标准^[3]: (1) 如果空白对照孔斑点数 < 5 个, 检测孔斑点数减去空白对照孔斑点数 ≥ 6 ; (2) 如果空白对照孔斑点数 ≥ 6 个, 检测孔斑点数必须 > 2 倍的空白对照孔斑点数。

1.4 PPD 试验

取受试者左或右前臂掌侧下 1/3 处皮内注入 PPD 0.1 mL (含 BCG-PPD 5 IU), 72 h 后检查注射部位的反应, 测量浸润硬结横径及垂直径的平均值, 浸润硬结平均直径 < 5 mm 为阴性, ≥ 5 mm 为阳性。

1.5 结核抗体检测

按试剂盒说明书操作。有一项弱阳性或二项均为弱阳性即认为阳性。

1.6 实时荧光定量

[作者简介] 万荣 (1978~), 女, 湖北黄石市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事结核内科临床工作。

PCR (TB-DNA), 取胸腔积液约 3~5 mL, 按说明书操作. TB-DNA 大于 4×10^3 拷贝/L 作为阳性标准.

1.7 统计学分析

应用 SPSS 软件进行统计学分析, 计数资料用率或构成比表示, 多个样本率的比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 结核性胸膜炎诊断方法

本组 150 例结核性胸膜炎患者中仅 8 例胸水查抗酸杆菌为阳性, 结核菌阳性率为 5.3% (8/150), 另有 1 例为胸腔镜胸膜组织培养为结核分枝菌培养阳性, 5 例不明胸腔积液患者通过胸腔镜镜下观察, 符合结核干酪样改变. 大部分结核性胸腔积液患者通过胸水常规化验、胸水 ADA、诊断性抗结核治疗胸水有吸收等实验室检查方法诊断.

2.2 4 种方法敏感度结果

4 种方法的敏感度比较见表 1. T-SPOT.TB 与 PPD 比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 19.013$, $P = 0.000$), T-SPOT.TB 与结核抗体、TB-DNA 比较有统计学差异 ($\chi^2 = 124.741$ 和 214.087 , $P = 0.000$).

2.3 4 种方法特异性比较

4 种方法的特异性比较见表 2. T-SPOT.TB 与 PPD 比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.222$, $P < 0.05$); T-SPOT.TB 与结核抗体、TB-DNA 比较差异无统计学差异 ($\chi^2 = 1.934$ 和 1.014 , $P > 0.05$).

表 1 结核性胸膜炎组 T-SPOT.TB、PPD、结核抗体和 TB-DNA 敏感度比较

诊断方法	n	阳性 (n)	敏感性 (%)
T-SPOT.TB	150	138	92.0
PPD	130	94	72.3*
结核抗体	149	43	28.9*
TB-DNA	149	11	7.4*

与 T-SPOT.TB 比较, * $P < 0.05$.

表 2 非结核组 T-SPOT.TB 与 PPD、结核抗体、ESR 特异性比较

诊断方式	n	阴性 (n)	特异性 (%)
T-SPOT.TB	36	35	97.2
PPD	36	28	77.8*
结核抗体	36	32	88.9
TB-DNA	36	36	100.0

与 T-SPOT.TB 比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

胸腔积液的病因比较复杂, 其中肿瘤、炎症、结核均可导致其出现胸水, 本组资料 36 例非结核胸腔积液患者, 其中 1 例年轻女性不明原因多浆膜腔积液, 最终经骨髓涂片确诊为白血病, 因此对胸腔积液诊断较为复杂. 结核性胸腔积液在临床上较为常见, 而采用胸水涂片找结核杆菌的阳性率低, 仅 7%~13%^[1,2], 本组研究资料结果仅 5.3%, 较文献报道更低, 不利于结核病早期诊断与治疗. 在本组研究中, 笔者采用 T-SPOT.TB 和常规 TB-DNA、PPD、结核抗体检测, 结果发现 T-SPOT.TB 阳性率在结核性胸腔积液中最高, 而在非结核性胸腔积液中特异性也较高.

T-SPOT.TB 试剂盒是由 ELISPOT 发展而来, 已经在欧美上市并得到广泛应用. 2008 年 Pai^[3] 等对 T 细胞 IFN- γ 释放试验的应用研究进行了综述, T-SPOT.TB 总的敏感性为 90% (86%~93%), 总特异性为 93% (86%~100%). Losi 等^[4] 应用 T-SPOT.TB 试剂盒以 ESAT-6 及 CFP-10 为特异性抗原于欧洲选取了 20 例结核性胸膜炎和 21 例非结核性胸膜炎患者, 分别对 2 组的 PBMC 和胸液单个核细胞 (pleural effusion mononuclear cells, PEMC) 进行 ELISPOT 检测. 在观察组中, PBMC 的 ELISPOT 敏感性为 90%, 特异性为 67%; PEMC 的 ELISPOT 的敏感性为 95%, 特异性为 76%. 因此对 PEMC 进行 ELISPOT 检测有可能作为诊断结核性胸膜炎的比较快速可靠的方法. 王永生等^[5] 对 24 例胸膜结核患者中, 23 例 T-SPOT 试验阳性 (95.8%), 在对照组 25 例中 T-SPOT 试验阳性有 5 例 (20%). 利用 T-SPOT.TB 试验检测以此诊断活动性胸膜结核的敏感性和特异性分别为 95.8% 和 80%. 阳性预测值为 82.1%, 阴性预测值为 95.2%. 本院尚未开展对 PEMC 进行 T-SPOT.TB 检测, 本组研究患者样本均采用 PBMC 检测, 其阳性率为 92%, 与国内外报道相当. 应用 PCR 检测结核杆菌 DNA 具有快速和敏感性高的优点, 有研究^[6] 显示结核杆菌 DNA 诊断结核性胸膜炎的敏感性为 35%~82%, 特异性为 85.4%~100%. Smach^[7] 指出 PCR 对结核性胸水的诊断的敏感度及特异性在 24%~60% 以及 80%~100% 之间. 本研究 PCR TB-DNA 诊断结核性胸膜炎的敏感性仅为 7.4%, 与以上报道相差较大, 考虑样本数较大, 不能排外实验室误差可能; 特异性为

100%，是各种实验方法中特异性最高的。PPD 是检查结核病的传统方法，阳性者表示受试者已感染过结核分枝杆菌而有抗结核杆菌的免疫力，并不一定有结核病^[8]，本组病例中 PPD 敏感性仅次于 T-SPOT.TB，可作为一种辅助诊断方法。

综上所述，T-SPOT.TB 技术简便、快速，具有较高的敏感性和特异性，能对结核性胸膜炎诊断提供很好的依据，是结核性胸膜炎良好的实验室诊断手段，具有较高的应用价值和广阔的前景。笔者下一步拟扩大样本量，并比较 PBMC 和 PEMC 的 T-SPOT.TB 的敏感性。

[参考文献]

- [1] GEROGIANNI I, PAPANICOLAOU M, TSOPA P, et al. Could IFN- γ predict the development of residual pleural thickening in tuberculous pleurisy[J]. *Monaldi Arch Chest Dis*, 2008, 69(1):18-23.
- [2] ZEMLIN A E, BURGESS L J, CARSTENTS M E. The diagnostic utility of adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous pleural effusions [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(2):214-220.
- [3] PAI M, ZWERLING A, MENZIES D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update [J]. *Aan Intern Med*, 2008, 149: 177-184.
- [4] LOSI M, BOSSINK A, CODECASA L, et al. Use of a T-cell interferon- γ release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. *Eur Respir J*, 2007, 30(6):1 173-1 179.
- [5] 王永生, 徐小雅, 杨华, 等. T-SPOT.TB 试剂盒在结核性胸膜炎临床诊断中的应用价值 [J]. *四川医学*, 2011, 12(32):1 854-1 856.
- [6] TRAJMAN A, KAISERMANN C, LUIZ R R, et al. Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2007, 67(8):877-884.
- [7] SMACH M A, GAROUCH A, CHARFEDDINE B, et al. Diagnostic value of serum and pleural fluid adenosine deaminase activity in tuberculous pleurisy [J]. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2006, 64(3):265-270.
- [8] 戴骏, 徐玉婵, 朱文英. TB-DNA、TB-DOT、BCG-PPD 检测在痰菌阴性肺结核诊断中的价值[J]. *山东医药*, 2009, 49(50):50-52.

(2013-07-02 收稿)

征稿启事

为进一步支持和推动昆明医科大学学科建设的发展，使《昆明医科大学学报》的学术质量得到进一步的提升，《昆明医科大学学报》编辑部决定自 2012 年 1 月 1 日起，国家自然科学基金资助课题的综述可以在学报正刊发表，另外对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医科大学“十二五”省级、校级重点学科立项建设的研究论文，给予优先刊登发及优稿优酬的奖励机制。欢迎广大科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿。网上投稿 <http://kmykdx.cnjournals.cn>，电话：0871-65936489，0871-65933621，0871-65333437。

昆明医科大学学报编辑部
2013 年 1 月 1 日

椎管内恶性黑色素细胞瘤 1 例报道

张振光, 李仲夏, 田 伟, 李宗芳
(昆明医科大学第一附属医院, 云南昆明 650032)

[关键词] 椎管; 黑色素瘤; 恶性

[中图分类号] R445.2 [文献标识码] A [文章编号] 2095-610X (2013) 09-0137-02

原发性黑色素细胞肿瘤是一种起源于软脑脊膜的良、恶性肿瘤, 临床少见. 而原发于椎管内的黑色素细胞瘤则更为罕见, 笔者于 2012 年 8 月在临床实践中碰到椎管内恶性黑色素细胞瘤 1 例, 现将诊治情况报告如下.

1 临床资料

患者男, 38 岁, 左侧腰痛 4 个月, 有时左腹皮痛. 查体: 左腰、左肾区叩痛.

MR 表现: $T_{12} \sim L_1$ 水平椎管内髓外硬膜下左侧椎间孔内外见一不规则形以短 T_2 、稍短 T_1 信号为主混杂信号的占位 (图 1), 沿左侧椎间孔内椎管外及椎旁蔓延, 增强扫描病灶未见明显强化, 病灶大小约 $3.5 \text{ cm} \times 1.4 \text{ cm} \times 3.5 \text{ cm}$, 相应水平脊髓受压向右侧移位, T_{12} 椎体后缘稍受压 (见图 2).

MRI 诊断: $T_{12} \sim L_1$ 水平椎管内髓外硬膜下占位性病变, 多考虑血肿, 神经鞘瘤待排.

手术所见: 病灶位于髓外硬膜下左侧, 沿椎间孔跨椎管内外, 包膜完整, 呈浅红色, 部分呈蓝色, 质韧, 哑铃形, 血供一般, 由一根脊神经穿过. 切开包膜可见肿瘤囊内充满陈旧机化血肿.

病理诊断: ($T_{12} \sim L_1$ 椎管内占位) 结合免疫组化及 HE 形态 (图 3、图 4) 考虑恶性黑色素细胞瘤.

2 讨论

中枢神经系统黑色素细胞肿瘤可分为原发性和转移性两种. 原发性黑色素细胞肿瘤是一组起源于软脑脊膜的弥漫性或局限性的良性或恶性肿瘤^[1], 临床少见, 占颅内肿瘤的 $0.07\% \sim 0.17\%$ ^[2]. 原发于椎管内黑色素瘤则更为罕见. 椎管内黑色素细胞

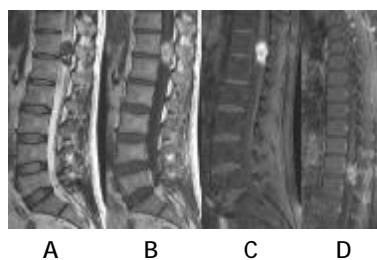


图 1 髓外硬膜下占位位于 $T_{12} \sim L_1$

A: 矢状位 T2WI, 占位呈短 T_2 信号改变; B: 矢状位 T1WI, 占位呈短 T_1 信号改变; C: 矢状位 T1WI 抑脂, 占位仍呈短 T_2 信号改变; D: 矢状位 T1WI 增强, 占位没有明显强化.



图 2 横断位 T2WI 占位位于椎管内, 横跨椎间孔生长

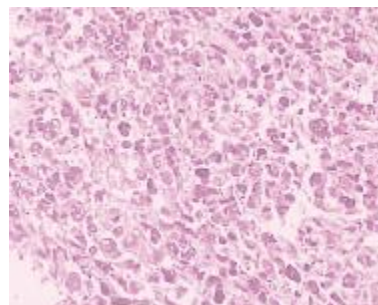


图 3 HE 染色 ($\times 200$)

[作者简介] 张振光 (1981~), 男, 吉林蛟河市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事医学影像诊断工作.

[通讯作者] 李宗芳. E-mail: lizf111@126.com

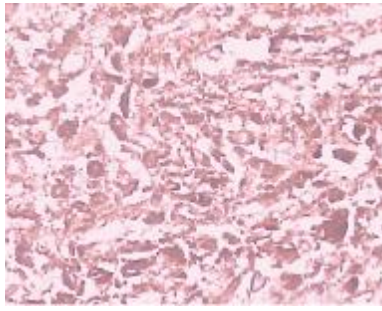


图4 免疫组化 HMB45 (+) ($\times 200$)

瘤好发于脊神经根附近，多为髓外硬膜下或硬膜内外病变，神经根受压导致根性疼痛常为最初临床表现。

由于黑色素细胞肿瘤中的黑色素颗粒是一种顺磁性物质，它能够缩短 T1、T2 弛豫时间^[3]，所以典型的黑色素瘤呈现短 T1、短 T2 信号表现。但由于黑色素颗粒的多少以及肿瘤出血情况，并不是所有黑色素瘤都有这种典型 MR 表现。Isiklar^[4]等根据黑色素瘤内黑色素含量不同，将 MR 表现分为 4 型：（1）黑色素型，T1WI 为高信号，T2WI 为低信号；（2）无黑色素型，T1WI 为低或等信号，T2WI 为高或等信号；（3）混合型，与前 2 型的任何一型都不相同；（4）出血型，表现不同时期 MR 血肿特征。Gaviani 等^[5]报道，瘤内黑色素含量与 T1 呈正相关，即黑色素含量越高，T1WI 信号越高；而黑色素含量与 T2 无相关性，但 T2 对小病灶的检测更敏感。不能单凭 MRI 来诊断是黑色素性黑色素瘤还是无黑色素性黑色素瘤，因为黑色素瘤容易出血，出血后的血肿影像掩盖了真实的

MR 表现。

椎管内黑色素细胞肿瘤主要和脊膜瘤及神经鞘瘤相鉴别。三者都好发胸腰段，以髓外硬膜下病变为主，可多发。脊膜瘤一般为等 T1、等 T2 信号，强化明显、均一，肿瘤可钙化出现低信号。神经鞘瘤一般为长 T2、长 T1 信号，容易出现囊变坏死，表现为信号不均，不均匀混杂强化。黑色素瘤多起源于神经根周围，典型的含黑色素颗粒肿瘤呈短 T1 高信号、短 T2 低信号^[6]。

[参考文献]

- [1] LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system[J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2):97-109.
- [2] 王亚明, 田增民. 椎管内原发性黑色素瘤的诊断和治疗[J]. *海军总医院学报*, 2008, 12(21):222-225.
- [3] 孟庆勇, 余永强. 颅内黑色素瘤 MRI 诊断[J]. *实用放射学杂志*, 2008, 12(24):1585-1587.
- [4] ISIKLAR I, LEEDSNE N E, FULLER G N, et al. Intracranial metastatic melanoma: correlation between MR imaging characteristics and melanin content[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 1995, 165(6):1503-1512.
- [5] GAVIANI P, MULLINS M E, BRAQA T A, et al. Improved detection of metastatic melanoma by T2-weighted imaging[J]. *AJNR*, 2006, 27(3):605-608.
- [6] 任爱军, 王亚明. 中枢神经系统黑色素细胞肿瘤的影像学分析[J]. *临床放射学杂志*, 2009, 28(7):917-920.

(2013-02-14 收稿)