

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