

· 基础论著 ·

酶联免疫斑点法在快速诊断活动性肺结核中的应用

吴妹英 王霞芳 肖玉梅 陈嘉臻 苏晓迪 王森 张舒 邵凌云 张文宏 翁心华

【摘要】 目的 探讨酶联免疫斑点法(ELISPOT)在临床快速诊断活动性肺结核病中的应用价值。**方法** 采用 T-SPOT. TB 试剂盒对 36 例明确诊断为活动性肺结核的初治患者、30 例健康体检者的外周血中结核分枝杆菌特异性 T 淋巴细胞进行检测,同时对 26 例活动性肺结核患者做结核菌素(PPD)试验。**结果** 在 36 例活动性肺结核初治患者和 30 例健康对照者中,T-SPOT 检测的阳性率分别为 80.6% 与 6.7%,此技术用于诊断初治活动性肺结核患者的敏感性为 80.6%,特异性为 93.3%,阳性预测值为 93.5%,阴性预测值为 80.0%。在 26 例同时做 PPD 试验的活动性肺结核患者中,T-SPOT 检测的阳性率略高于 PPD 试验(80.6% vs 61.5%),但差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 酶联免疫斑点法是一种具有较高敏感性和特异性的检测结核感染的技术,在活动性肺结核病的快速诊断中有较大应用价值。

【关键词】 活动性肺结核;分枝杆菌;诊断;结核菌素试验;酶联免疫斑点(ELISPOT)技术

Clinical application of enzyme-linked immunospot assay for rapid detection of active pulmonary tuberculosis infection WU Mei-ying, WANG Xia-fang, XIAO Yu-mei, CHEN Jia-zhen, SU Xiao-di, WANG Sen, ZHANG Shu, SHAO Ling-yun, ZHANG Wen-hong, WENG Xin-hua. Department of Tuberculosis Infection, the Fifth People's Hospital, Suzhou 215007, China

Corresponding author: ZHANG Wen-hong, Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical application of enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for rapid detection of active pulmonary tuberculosis. **Methods** Rapid T-SPOT. TB assay was employed to detect Mycobacterium tuberculosis antigen specific T cells in blood samples from 36 patients with active pulmonary tuberculosis receiving initial anti-tuberculosis treatment shorter than 1 month and 30 healthy individuals. The conventional PPD skin test was performed on 26 patients with active tuberculosis at the same time. **Results** By the T-SPOT. TB assay, positive

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2005CB523102);国家自然科学基金资助项目(30400369)

作者单位:215007 苏州市,江苏省苏州市第五人民医院结核病科(吴妹英、王霞芳、肖玉梅);复旦大学遗传所(陈嘉臻、苏晓迪);复旦大学附属华山医院感染科(王森、张舒、邵凌云、张文宏、翁心华)

通讯作者:张文宏,Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn

rates for the 36 patients with active tuberculosis and 30 healthy controls were 80.6% and 6.7%, respectively. For diagnosing active pulmonary tuberculosis, this assay had a sensitivity of 80.6%, specificity of 93.3%, positive predictive value of 93.5% and negative predictive value of 80.0%. The positive rate of T-SPOT. TB assay was higher than that of PPD skin test in 26 patients (80.6% vs 61.5%), but no significant difference was found ($P > 0.05$). **Conclusions** T-SPOT. TB assay is a rapid, more sensitive and specific method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. It will be a useful tool to early and rapidly diagnose active pulmonary tuberculosis infection in China.

【Key words】 Active pulmonary tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculin test; Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay

结核病(Tuberculosis, TB)一直是人们关注的一个全球性健康问题。据WHO估计,全球约有1/3人口受到结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染,全世界每年都有新发结核病例830万以及死亡病例180万^[1]。我国肺结核的发病率位于世界第二,每年新增结核病患者约150万,受感染人数约5亿。

在结核病防治中,我国面临的重大难题之一是如何快速准确诊断结核病患者。目前临床应用最多的仍是痰抗酸杆菌涂片和结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)皮试,前者阳性率低,后者由于与卡介苗(BCG)存在交叉反应而导致特异性较差^[2]。金标准是结核分枝杆菌培养,特异性虽高但敏感性太低,而且需时较长,给临床及时诊断结核病带来困难。近年来,Lalvani等^[3]提出利用高灵敏度的酶联免疫斑点(enzyme-linked immunospot, ELISPOT)技术检测结核分枝杆菌感染,为早期发现结核病提供了新的方向。这种新型的免疫检测技术使用结核分枝杆菌Mtb特异性抗原刺激外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PB-MC),通过细胞因子 γ 干扰素(IFN- γ)的分泌检测抗原特异性T淋巴细胞的应答反应,从而判断结核感染状态,具有较高的敏感性和特异性。本研究采用英国Oxford Immunotec开发的T-SPOT. TB试剂盒检测活动性肺结核病初治患者和健康体检者外周血中Mtb特异性抗原T淋巴细胞的应答,以探讨其在结核病临床快速诊断中的应用价值。

材料和方法

一、研究对象

从江苏省苏州市第五人民医院结核病科2008年4月至6月间住院患者中收集明确诊断的活动性肺结核患者36例,均符合以下诊断标准之一:(1)2次痰涂片抗酸杆菌(+)或痰培养分枝杆菌(+),胸X线片有肺结核特征病灶;(2)痰涂片或培养2次以上(-),胸部X线片示活动性肺结核征象,伴有咳嗽、发热、咳痰、血痰或咯血、胸闷、气短、胸痛、疲乏等临床表现。36例均为抗痨治疗初治患者,疗程在1个月以内。

从复旦大学学生及教职工中入选健康对照者 30 例,无已知结核病接触史,胸片无异常,痰培养阴性。

二、材料

RPMI 1640 培养液;PBS 缓冲液;AIM-V 培养基(均购自 GIBCO 公司);Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液(购自 CEDARLANE 公司);T-SPOT. TB 试剂盒(上海复星科技有限公司提供),该试剂盒中包含有:预包被小鼠抗人 IFN- γ 单抗的 96 孔微孔培养板;Mtb 特异性混合多肽 ESAT-6(early secreted antigenic target 6-kDa)及 CFP-10(culture filtrate protein 10)(Oxford Immunotec Ltd., Oxford, UK);阳性对照植物凝集素 PHA;浓缩的碱性磷酸酶标记小鼠抗人 IFN- γ 单抗;底物显色剂 BCIP/NBT PLUS。

三、方法

1. PPD 试验:对所有入选者皮内注射 5 IU (1:2000)的人型 PPD 试剂(北京祥瑞生物制品有限公司生产),72 h 后观察结果,有红肿硬结且直径 ≥ 5 mm 者或有水疱或破溃者判为 PPD 试验阳性,否则判为阴性。

2. T-SPOT. TB 检测:(1)外周血单个核细胞的分离、收集与计数:每个入选病例采集肝素抗凝外周血 4 ml,加入等体积 RPMI 1640 培养液混匀后按体积比 3:1 加在淋巴细胞分离液上层,3000 r/min 水平离心 20 min 后用毛细滴管吸取中间层云雾状细胞(PBMC),用 RPMI 1640 培养液洗涤 PBMC 两次,进行显微镜下细胞计数,根据计数结果用 AIM-V 培养基调节剩余细胞悬液浓度至 2.5×10^6 /ml;(2)体外抗原刺激与孵育:在已包被小鼠抗人 IFN- γ 单抗的微孔培养板中,分别加入作为阴性对照的 AIM-V 培养基、阳性对照植物凝集素 PHA、Mtb 特异性混合多肽 ESAT-6 与 CFP-10 各 50 μ l,然后在每孔中加入调整好浓度的细胞悬液 100 μ l,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养 16~20 h 后用 PBS 缓冲液洗板 4 次,加入新鲜稀释的碱性磷酸酶标记单抗 50 μ l,2~8 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h 后洗板 4 次。最后每孔加入显色底物溶液 50 μ l,室温下静置反应 7 min 后用计算机辅助成像分析系统进行斑点阅读与计数;(3)结果判定:当 ESAT-6 与 CFP-10 测试孔任一孔达到以下标准即判定为阳性:若阴性对照孔斑点数为 0~5 个,测试孔斑点数减去阴性对照孔斑点数 ≥ 6 个;若阴性对照孔斑点数 ≥ 6 个,测试孔斑点数必须 ≥ 2 倍阴性对照孔斑点数。

四、统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件,采用卡方检验(Chi-Square test)、Fisher 确切概率法和配对卡方检验(McNemar test)对各组检出阳性率进行统计学分析;采用 Wilcoxon 配对秩和检验对多肽抗原特异性 T 细胞免疫应答强度进行统计学分析。

结 果

一、入选病例基本情况

我们对 36 例活动性肺结核患者的基本情况进行了调查,包括男性 27 例,女性 9 例,中位年龄 60 岁(15~85 岁)。其中初发患者 27 例,复发患者 9 例。有 26

例患者完成了 PPD 皮试,结果 16 例阳性,10 例阴性。健康对照组 30 例,无结核接触史,无发热、咳嗽等症状,胸片无异常,痰培养阴性,PPD 试验均阴性。

二、T-SPOT. TB 检测结果

1. T-SPOT. TB 检测在活动性肺结核初治患者中的诊断价值评估:活动性肺结核初治(抗痨疗程 1 个月内)患者 36 例,健康对照 30 例,T-SPOT. TB 检测的阳性率分别为 80.6% (29/36 例)与 6.7% (2/30 例),故此技术用于活动性肺结核初治患者诊断的敏感性为 80.6%, 特异性为 93.3%, 阳性预测值为 93.5%, 阴性预测值为 80.0% (表 1)。

表 1 T-SPOT. TB 检测在活动性肺结核初治(疗程 1 个月内)患者的诊断学评价

	T-SPOT 阳性(例)	T-SPOT 阴性(例)	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值
活动性肺结核患者($n=36$)	29	7	80.6%	—	93.5%	—
健康对照($n=30$)	2	28	—	93.3%	—	80.0%

2. T-SPOT. TB 检测阳性率与结核病初发及复发的相关性分析:36 例活动性肺结核患者中有结核病初发患者 29 例,其中 T-SPOT 检测阳性 23 例,阴性 6 例,阳性率为 75.9%。有结核病复发患者 7 例,其中 T-SPOT 检测阳性 6 例,阴性 1 例,阳性率为 85.7%,略高于初发患者组,但两组之间没有显著性差异($P > 0.05$)。

3. T-SPOT. TB 检测与 PPD 皮试在活动性肺结核患者中检出阳性率的比较:共有 26 例活动性肺结核患者完成了 PPD 皮试,其中 16 例阳性,10 例阴性,阳性率为 61.5%,低于 T-SPOT 检测的阳性率(80.6%),但差异无显著统计学意义($P > 0.05$)。

4. 活动性肺结核患者对 Mtb 特异性多肽抗原的 T 细胞免疫应答强度分析:36 例患者中,27 例对 ESAT-6 混合多肽抗原具有显著应答,阳性率为 75.0%;22 例对 CFP-10 混合多肽抗原具有显著应答,阳性率为 61.0%。说明在初治患者中经 ESAT-6 抗原诱导刺激的 T-SPOT 检测阳性率略高于 CFP-10 抗原,但差异无统计学意义($P = 0.18$)。经 ESAT-6 抗原诱导刺激产生的平均斑点形成细胞数(spot-forming cells, SFCs)为 211/106 PBMC,中位数为 130/106 PBMC,标准差为 238/106 PBMC。经 CFP-10 抗原诱导刺激产生的平均 SFCs 为 511/106 PBMC,中位数为 198/106 PBMC,标准差为 748/106 PBMC (表 2)。可见 CFP-10 特异性的 SFCs 要明显高于 ESAT-6 特异性的 SFCs ($P = 0.029$)。

表 2 活动性肺结核患者对 Mtb 特异性多肽抗原的 T 细胞免疫应答强度评价

	平均 SFCs(/ 10^6 PBMC)	中位 SFCs(/ 10^6 PBMC)	标准差(/ 10^6 PBMC)	T-SPOT 阳性率
ESAT-6 混合多肽抗原	211	130	238	75%
CFP-10 混合多肽抗原	511	198	748	61%

注:SFCs(spot-forming cells, 斑点形成细胞);PBMC(peripheral blood mononuclear cells, 外周血单个核细胞)

讨 论

结核病的早期快速诊断已经成为制约结核病控制的关键因素。目前,常规结核病实验室检测方法诊断阳性率不到60%。为克服传统痰涂片、痰培养及结核菌素试验等检测方法的不足,近年来发展的以T细胞免疫应答为基础的 γ 干扰素释放实验,比结核菌素试验有更高的敏感性与特异性。其原理是被Mtb特异性抗原刺激而致敏的记忆T淋巴细胞,遇到同类抗原时能产生IFN- γ ,对分离的全血或PBMC在Mtb特异性抗原刺激后产生的IFN- γ 进行检测,就可以判断是否存在结核感染。其中T-SPOT.TB检测采用的Mtb特异性抗原为ESAT-6和CFP-10,其编码基因RD1(Region of Deletion 1)是BCG和绝大多数非结核分枝杆菌所缺失的基因^[4],因此避免了传统结核菌素皮试中所存在的BCG交叉抗原反应,能够较好地地区分真性结核感染或BCG接种诱导的假阳性反应。在发达地区T-SPOT.TB检测主要用于帮助诊断儿童中的无症状结核感染和结核病患者及HIV感染患者合并结核感染的诊断,或用于结核潜伏感染的流行病学调查^[5]。有报道使用两种多肽抗原的敏感性要高于任何单一抗原的敏感性^[6],因此本研究应用T-SPOT.TB技术,将ESAT-6和CFP-10两种混合多肽的检测结果进行联合判断,只要对任何一种多肽的T细胞免疫反应达到要求就判读为阳性。

本研究中,我们对36例诊断明确并且抗痨疗程在1月以内的活动性肺结核初治患者进行了盲法T-SPOT.TB技术的检测。结果表明该法诊断活动性肺结核患者的敏感性为80.6%,特异性为93.3%,略低于国外同类研究。有国外报道T-SPOT.TB检测诊断HIV阴性结核患者的敏感性在83%~98%之间^[4-8],而在BCG接种过但没有结核暴露史的健康对照组中特异性为100%^[8,9-12]。另外国内一项相关研究显示该法诊断中国人群结核患者的敏感性为95%,健康人群中特异性为93%^[13]。本研究结果中诊断特异性与国内同类研究相当,略低于国外的同类研究,这可能与中国人群中基础结核潜伏感染率较高有关。本研究中活动性肺结核患者均为初次抗痨治疗1月以内人群,排除了抗痨治疗对于免疫诊断的影响。但本研究结果的敏感性仍略低于国内外数据,差异原因有待进一步研究。本次研究中结核菌素皮试(PPD试验)敏感性为61%,低于T-SPOT.TB检测的敏感性,说明在我国活动性肺结核初治(疗程1个月内)病例中,T-SPOT.TB可能是更为有效的诊断方法,效果优于传统的PPD皮试。

另外,此次研究中还发现在活动性肺结核初治患者组中,虽然经CFP-10抗原诱导的T-SPOT检测阳性率略低于ESAT-6抗原(61% vs 75%),但是CFP-10特异性的斑点形成细胞数明显高于ESAT-6特异性的斑点形成细胞数,即说明CFP-10诱导的T细胞免疫应答强度显著高于ESAT-6诱导的T细胞免疫应答强度。这个结论也为研究ESAT-6混合多肽和CFP-10混合多肽哪个是更有效的诊断抗原增添了复杂性。

通过本次研究,我们认为T-SPOT.TB技术在我国用于诊断活动性肺结核初治患者具有较高的敏感性和特异性,用于初发疑似结核患者的诊断效果优于传统

的 PPD 皮试。同时考虑到 T-SPOT. TB 检测简便快速、可定量、不用复查等特点,该方法的应用对我国防治结核病工作的开展具有重要价值。

志 谢

本研究的细胞免疫学实验在复旦大学附属华山医院感染科实验室完成,在此对该实验室负责人以及工作人员所提供的帮助表示感谢。

参 考 文 献

- 1 World Health Organization. The stop TB Department. WHO report 2005. Global tuberculosis control-surveillance, Planning, Financing.
- 2 Huebner RE, MF Schein, JB Bass. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis, 1993,17:968-975.
- 3 Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T cells. Am J Respir Crit Care Med, 2001,163: 807-808.
- 4 Behr MA, MA Wilson, WP Gill, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray. Science, 1999, 284:1520-1523.
- 5 Lalvani A, Frop DM. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century-new tools to tackle an old enemy. Chest,2007,131: 1898-1906.
- 6 Philip C, Jackson-Sillah D, Fox A, et al. ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein and Peptides for optimal Diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia. J Clin Microbiol,2005,43:2070-2074.
- 7 Meier T, Rulenbruch HP, Wrighton-Smith P, et al. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay(T-SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005,24:529-536.
- 8 Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med, 2001,163:824-828.
- 9 Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, et al. Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in Mycobacterium tuberculosisinfected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. J Immunol, 2001, 167:5217-5225.
- 10 Ferrara G, Losi M, D' Amico R, et al. Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with Mycobacterium tuberculosis: a prospective study. Lancet,2006,367:1328-1334.
- 11 Lee JY, Choi HJ, Park IN, et al. Comparison of two commercial interferon gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection. Eur Respir J,2006,28:24-30.
- 12 Zellweger JP, Zellweger A, Ansermet S, et al. Contact tracing using a new T-cell-based test: better correlation with tuberculosis exposure than the tuberculin skin test. Int J Tuberc Lung Dis, 2005,9:1242-1247.
- 13 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. 中华检验医学杂志, 2006, 11: 1005-1008.

(收稿日期:2008-10-21)

(本文编辑:温少芳)

吴妹英,王霞芳,肖玉梅,等. 酶联免疫斑点法在快速诊断活动性肺结核中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染杂志:电子版, 2009,3(2):125-130.