

结核病免疫学诊断新进展——T-SPOT. TB

霍霏霏 刘晓清

结核病一直是危及人类健康的最主要传染病之一,在全球所有传染性疾病中,结核病已成为成年人的首要死因。据 WHO 估计,2007 年全球约有 927 万新发结核患者,175 万人死于结核病^[1]。我国是全球 22 个结核病高负担国家(占全球结核病例的 80%)之一,仅次于印度。2000 年中国第四次全国结核病流行病学调查显示活动性肺结核患病率为 367/10 万,菌阳肺结核患病率为 160/10 万,涂阳肺结核患病率为 122/10 万^[2]。2007 年我国结核发病例数为 130 万^[1]。

一、结核病免疫学诊断方法——皮肤结核菌素试验

皮肤结核菌素试验(tuberculin skin test, TST)作为结核分枝杆菌感染诊断方法之一已近一个世纪,其作为应用最广泛的结核病的免疫学诊断方法,操作简便易行,成本低廉。但 TST 作为确定或排除结核菌感染的标准还存在很多局限性,首先表现为特异性较低,结核菌素试验中使用的纯蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD),是从结核分枝杆菌中粗提的抗原混合物,这一混合物中有超过 200 种抗原成分与卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin, BCG)和非结核分枝杆菌的抗原成分相同,容易发生交叉反应。我国是结核病高流行国家,BCG 接种较为普及,且非结核分枝杆菌感染率也较高,使结核菌素试验方法出现了较高的假阳性率,诊断特异性较低。其次,结核菌素试验对于感染结核菌 2 周之内、近期免疫抑制的病人特别是合并人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染、重症疾病者、年幼儿童及营养不良、器官移植者,缺乏足够的灵敏度^[3]。这使得结核菌素试验在结核病诊断应用中受到限制。因此,寻找新的特异性、敏感性高的检测结核感染的方法成为人们关注的热点。在这样的背景下,用于结核病诊断的 T-SPOT. TB 检测应运而生。

二、T-SPOT. TB 检测原理

用于结核病诊断的 T-SPOT. TB 检测的产生基于以下两点。第一,结核分枝杆菌的基因组被克隆,与 BCG 和其他非结核分枝杆菌基因组进行比较,发现了结核分枝杆菌特有的片段即缺失区域(deletion region, RD)^[2,3],包括 RD1-RD16,除极少数非结核分枝杆菌外,RD1 片段表达的蛋白为结核分枝杆菌所特有,且不存在于 BCG 中,因此不会与 BCG 接种后的免疫反应发生交叉反应^[4];第二,免疫学的研究发现效应 T 细胞被近期暴露的抗原在体外再次刺激后会释放 γ -干扰素,因此通过体外检测针对某一抗原的效应 T 细胞,可以判断近期体内的抗原暴露

情况。Lalvani 等^[5]首先将此原理用于结核病的诊断,其使用 RD1 基因编码的早期分泌靶抗原 6(early secreted antigenic target 6, ESAT-6)和培养过滤蛋白 10(culture filtrate protein 10, CFP-10)作为抗原,体外刺激从外周血分离的单核细胞,计数释放 γ -干扰素的细胞数,以协助诊断结核感染的存在。T-SPOT. TB 检测所应用的方法为酶联免疫斑点技术(enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT),其可检测经结核分枝杆菌特异性抗原刺激后释放 γ -干扰素的细胞数量,经过多年大量的研究与临床试验,应用 ELISPOT 技术体外检测经结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6 或 CFP-10 刺激后释放 γ -干扰素的细胞技术日趋完善,该试剂盒 2004 年首先在欧洲上市,2005 年在加拿大被批准使用,2008 年 7 月通过美国 FDA 审批。基于相同原理,可以不分细胞而直接向外周血中加入结核分枝杆菌特异性抗原进行刺激,之后应用 ELISA 方法测定 γ -干扰素的浓度,据此生产的试剂盒 QuantiFERON-TB GOLD 已于 2005 年通过,在美国被广泛应用^[6]。

三、T-SPOT. TB 在结核感染诊断中的应用

Lalvani 等^[5]对 47 例痰菌阳性的结核患者(其中 2 例肺外结核)进行 T-SPOT. TB 检测,结果显示 T-SPOT. TB 阳性率为 96%(45 例);对其中 26 例患者同时作 T-SPOT. TB 和皮肤结核菌素试验(TST),结果显示 T-SPOT. TB 阳性率为 92%(24 例),TST 阳性率为 69%(18 例),二者的阳性检出率比较差异有统计学意义。上述研究结果表明 T-SPOT. TB 检测诊断活动性结核感染比 TST 的灵敏度高。

肺外结核是指发生在肺部以外的全身其他脏器的结核病,能够单独的感染肺以外其他部位或者联合感染肺部。与肺结核相比,肺外结核的诊断通常更加困难,主要的原因之一是由于肺外结核缺乏肺部病变的特点,而且其病变的部位并不一致,典型的临床症状不明显^[7],T-SPOT. TB 检测对肺外结核有较高的敏感性,Kim 等^[8]随诊 72 例疑诊肺外结核患者的前瞻性研究显示,对于活动性肺外结核,T-SPOT. TB 的敏感性为 94%,TST 敏感性为 47%。

Piana 等^[10]入选了接触过痰菌阳性肺结核病人的免疫抑制患者 138 例,均患有血液系统疾病,包括非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、急慢性淋巴细胞白血病等。最终对 129 例患者进行了 T-SPOT. TB 检测,对 122 例患者进行了 TST 检测。统计分析结果显示 T-SPOT. TB 的阳性率为 44.2%,TST 的阳性率为 17.4%。进一步的研究显示,在外周血白细胞计数正常的患者 T-SPOT. TB 的阳性率为 44.6%,在外周血白细胞计数减少或增多($< 4.3 \times 10^9/L$ 或 $> 10.8 \times 10^9/L$)的患者 T-SPOT. TB 阳性率为 44.3%,而 TST 的阳性率分别为 25.9% 和 14.5%。以上数据说明在诊断免疫抑制人群的结核感染时,T-SPOT. TB 检测具有更高的敏感性。

结核性胸膜炎是导致胸腔积液的一个重要原因,在结核高发地区,其占胸腔积液病因的 25%^[11-13],传统的诊断结核性胸膜炎的方法包括检测胸腔积液的常规生化特征及 ADA 水平,但上述检测方法特异性较差^[11,14,15]。鉴于效应 T 细胞

有向病灶部位移动的特性,已有对胸腔积液进行T-SPOT. TB检测的报道,如 Wilkinson 等^[16]对 8 名确诊结核性胸膜炎(1 例合并结核性腹膜炎)患者的胸水单核细胞(1 例腹水)以及外周血单核细胞进行了 T-SPOT. TB 检测,结果显示胸腹水和外周血的T-SPOT. TB 检测均为阳性,同时胸腹水的阳性细胞计数远高于外周血的阳性细胞计数,平均为外周血阳性细胞计数的 15 倍;Lee 等^[17]对 40 名胸腔积液患者(19 例确诊结核性胸膜炎)的胸水和外周血单核细胞进行T-SPOT. TB检测,结果显示胸腔积液的 T-SPOT. TB 结果诊断结核性胸膜炎的敏感性和特异性分别为 94.7%、85.7%,外周血的 T-SPOT. TB 结果对于诊断的敏感性和特异性为 77.8%、90.5%,同时胸水的阳性细胞计数平均为外周血阳性细胞计数的 8~10 倍。以上结果表明对胸腔积液中的单核细胞进行 T-SPOT. TB 检测是诊断结核性胸膜炎的一个有效的方法。

Kobashi 等^[18]应用 T-SPOT. TB 检测进行疗效评估,他们对 40 例活动性结核病患者(其中 24 例活动性肺结核)进行 T-SPOT. TB 检测,治疗前其阳性率为 90%,治疗 6 个月后其阳性率降至 63%、9 个月后降至 58%、12 个月后降至 55%,与临床疗效一致,证明 T-SPOT. TB 检测对于结核病患者可进行疗效评估。

Pai 等^[19]对 2008 年 3 月 31 日之前纳入在 PUBMED 的报道 γ -干扰素释放分析试验敏感性 & 特异性的共 38 个研究资料进行了总结分析,其中分析 T-SPOT. TB 敏感性 & 特异性的研究均非来自于结核病高流行地区。对其中 13 个研究中的共 726 例入选者进行分析显示 T-SPOT. TB 检测的敏感性为 90% (CI, 86% ~ 93%),对 6 个研究中的 290 例患者进行分析显示 T-SPOT. TB 检测的特异性为 93% (CI, 86% ~ 100%)。

Kang 等^[20]在韩国首尔进行的一项前瞻性研究中入选了 144 例疑诊为肺结核的患者,最终 67 例确诊为活动性肺结核,统计分析结果显示 T-SPOT. TB 检测的敏感性为 92% (CI, 83% ~ 97%),特异性为 47% (CI, 36% ~ 59%),阳性预测值 60% (CI, 50% ~ 70%),阴性预测值 87% (CI, 73% ~ 96%)。TST 敏感性为 68% (CI, 56% ~ 79%),特异性 51% (CI, 39% ~ 62%),阳性预测值 55% (CI, 44% ~ 66%),阴性预测值 64% (CI, 51% ~ 76%)。上述结果表明 T-SPOT. TB 在诊断结核感染方面较 TST 敏感性高,虽然其阳性预测值较低限制了其在结核感染诊断中的应用,但其较高的阴性预测值有利于协助排除活动性结核病的诊断。

四、T-SPOT. TB 在结核感染诊断中的应用展望

综上所述,T-SPOT. TB 检测方法的主要优点是:(1)敏感性 & 特异性高,能从 60 000 个分泌 INF γ 的细胞中检测出 1 个细胞^[21],且受机体免疫状态的影响较小^[9];只有结核分枝杆菌和极少数非结核分枝杆菌^[22]才会出现阳性反应,而 BCG 及环境中的多数非结核分枝杆菌因不分泌 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白,因此本检测方法可区别 BCG 接种后出现的阳性反应。(2)本检测方法可应用于多方面:在活动性肺结核、肺外结核、潜伏性结核感染及免疫抑制的结核患者均能检测^[5,9],对胸腔积液中的单核细胞进行 T-SPOT. TB 检测有助于结核性胸膜炎的诊断^[17]。

(3) 诊断快速:能早期诊断结核感染,需时较短。(4) 可进行疗效评估:当结核分枝杆菌被清除后,效应 T 淋巴细胞即消失,测定效应 T 淋巴细胞也可检测机体是否清除了结核分枝杆菌,进行临床疗效评估^[18]。同时,T-SPOT. TB 试验也存在某些问题,其检测步骤繁琐,对实验室条件和技术的要求较高,且所需仪器和试剂昂贵,限制了其在多数低收入结核高负担国家的应用。目前,涉及T-SPOT. TB检测的研究在迅速开展,为了使该检测技术对临床的指导作用更加明确,必须经过大量、客观的临床试验。另外,由于结核分枝杆菌感染后的免疫反应与结核病的发生、发展和转归的关系尚未完全明了,至今所有的免疫诊断方法包括 T-SPOT. TB 检测尚不能完全鉴别诊断潜伏性结核感染与活动性结核感染,因此,开发以结核分枝杆菌特异性抗原为基础、能鉴别诊断潜伏性结核感染与活动性结核感染的免疫学诊断试剂已成为研究的新目标。

参 考 文 献

- 1 World Health Organization. WHO report 2009: global tuberculosis control, epidemiology, strategy, financing. 2009.
- 2 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25: 3-7.
- 3 Ozekinci T, Ozbek E, Celik Y. Comparison of tuberculin skin test and a specific T-cell-based test, T-Spot. TB, for the diagnosis of latent tuberculosis infection. J Int Med Res, 2007, 35: 696-703.
- 4 Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science, 1999, 284: 1520-1523.
- 5 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.
- 6 Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Glod test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. MMWR Recomm Rep, 2005, 54: 49-55.
- 7 Yoon HJ, Song YG, Park WI, et al. Clinical manifestation and diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. Yonsei Med J, 2004, 45: 453-461.
- 8 Kim SH, Choi SJ, Kim HB, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis. Arch Intern Med, 2007, 167: 2255-2259.
- 9 Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells. AIDS, 2002, 16: 2285-2293.
- 10 Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. Eur Respir J, 2006, 28: 31-34.
- 11 Sahn SA. State of the art. The pleura. Am Rev Respir Dis, 1988, 138: 184-234.
- 12 Valdés L, Alvarez D, Valle JM, et al. The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. Chest, 1996, 109: 158-162.
- 13 How SH, Chin SP, Zal AR, et al. Pleural effusions: role of commonly available investigations. Singapore Med J, 2006, 47: 609-613.
- 14 Epstein DM, Kline LR, Albelda SM, et al. Tuberculous pleural effusions. Chest, 1987, 91: 106-109.
- 15 Chen ML, Yu WC, Lam CW, et al. Diagnostic value of pleural fluid adenosine deaminase activity in tuberculous pleurisy. Clin Chim Acta, 2004, 341: 101-107.
- 16 Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. Clin Infect Dis, 2005, 40: 184-187.
- 17 Lee LN, Chou CH, Wang JY, et al. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculous pleurisy. Clin Microbiol Infect, 2009, 15: 173-179.
- 18 Kobashi Y, Mouri K, Yagi S, et al. Transitional changes in T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens dur-

ing treatment. J Infect, 2009, 58: 197-204.

- 19 Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med, 2008, 149: 177-184.
- 20 Kang YA, Lee HW, Hwang SS, et al. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. Chest, 2007, 132: 959-965.
- 21 Barnes PF. Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163: 807-808.
- 22 Arend SM, Van Meijgaarden KE, De Boer K, et al. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with Mycobacterium marinum or M. kansasii. J Infect Dis, 2002, 186: 1797-1807.
- 23 Behr MA, Wilson MA, Gill WP, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. Science, 1999, 284: 1520-1523.

(收稿日期: 2009-06-02)

(本文编辑: 孙荣华)

霍霏霏, 刘晓清. 结核病免疫学诊断新进展——T-SPOT. TB[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(2): 202-206.