

• 临床研究 •

T-SPOT. TB 技术在结核性胸膜炎诊断中的意义

刘 涛

(河南鹤壁市传染病医院检验科, 河南鹤壁 458000)

摘要:目的 探讨 T-SPOT. TB 技术在结核性胸膜炎诊断中的应用价值。方法 选择 42 例结核性胸膜胸腔积液患者及 42 例非结核性胸腔积液患者, 采用 T-SPOT. TB 技术检测胸腔积液及外周血中单个核细胞结核杆菌感染情况, 并与 PPD、抗酸杆菌染色结果进行比较, 对比不同方法对结核性胸膜炎的诊断性能。结果 胸腔积液 T-SPOT. TB、外周血 T-SPOT. TB、PPD 及抗酸杆菌涂片敏感度分别为 95.2%、80.9%、42.8% 及 11.9%, 胸腔积液 T-SPOT. TB、外周血 T-SPOT. TB、PPD 特异度分别为 90.4%、83.3%、54.7%, 胸腔积液及外周血 T-SPOT. TB 技术在诊断结核性胸膜炎敏感度高于 PPD 及抗酸杆菌涂片, 且胸腔积液 T-SPOT. TB 敏感度高于外周血, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 胸腔积液及外周血 T-SPOT. TB 方法特异度高于 PPD, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 采用 T-SPOT. TB 技术检测外周血和胸腔积液中单个核细胞结核杆菌感染有助于提高结核性胸膜炎的诊断率, 且胸腔积液中单个核细胞 T-SPOT. TB 敏感度高于外周血。

关键词: T-SPOT. TB 技术; 结核性胸膜炎; 胸腔积液

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.09.050

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)09-1283-02

结核病发病率在世界范围内近年来仍呈逐年上升趋势, 据调查 2010 年结核病新发病例达到 880 万, 而死于结核病的人数达 145 万人^[1], 因此本病已经成为一个世界性的问题。结核性胸膜炎是常见的仅次于淋巴结核的肺外结核, 好发于年轻人, 多呈急性发病过程, 临床多表现为胸膜性疼痛和干咳及单侧至少中等量的胸腔积液^[2]。结核性胸腔积液是目前最常见的胸腔积液, 约占全部胸腔积液的 50%, 一般发生于病程的 1~2 周, 积液量在单侧胸腔的 2/3 以下。本病若不及时诊治, 大约 60%~65% 可发展为活动性结核病^[3], 并且容易合并胸膜粘连、增厚等并发症。临床常用的 PPD 试验其特异度低, 而痰涂片找抗酸杆菌阳性率较低, 胸腔积液中找结核杆菌是目前确诊结核性胸膜炎的重要依据之一, 但是涂片结核分枝杆菌检出率仅为 0%~25%, 胸腔积液及胸膜活检标本培养阳性率有所提高, 但也仅为 8.5%~38.3% 及 11.7%~56.8%, 且培养耗时过长, 难以及时指导临床诊疗^[4]。虽然有报道经胸腔镜胸膜活检的病理组织检查阳性率为 86%~97%^[5], 但其为创伤性检查, 患者依从性差。因此, 目前对于结核性胸膜炎急需一种无创、快速、准确的诊断方法。本研究旨在探讨 T-SPOT. TB 技术诊断结核性胸腔积液的临床应用价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 1 月至 2013 年 6 月本院呼吸科住院治疗的 42 例结核性胸膜炎患者, 其中男 29 例, 女 13 例, 年龄 19~71 岁, 平均 (50.2 ± 9.4) 岁, 结核性胸腔积液诊断标准^[6]: (1) 胸腔积液或胸膜活检组织培养出结核分枝杆菌或结核分枝杆菌 DNA 检测阳性; (2) 临床诊断有低热、盗汗、胸痛等症状, 胸片、胸部 CT 符合结核病病表现, PPD 试验阳性或强阳性, 胸腔积液检查提示肿瘤细胞阴性, 肿瘤标志物阴性, 淋巴细胞大于 50%, 腺苷脱氨酶 (ADA) 大于 45 U/L, 抗结核治疗有效, 并可以排除肿瘤等其他原因导致的胸腔积液。随机选择同期住院治疗合并非结核性胸腔积液的患者 42 例, 其中男 27 例, 女 15 例, 年龄 19~76 岁, 平均 (54.2 ± 12.6) 岁。两组患者在年龄、性别、结核病史、卡介苗接种史方面比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究经医院伦理委员会批准, 所有患者自愿参与本研究并签署知情同意书。

1.2 观察指标 观察 TB-SPOT. TB 检测 PBMCs、PEMCs 诊断结核性胸膜炎的诊断性能, 并与传统 PPD、抗酸杆菌染色、结核菌培养进行对比。

1.3 方法 采用肝素钠抗凝细胞制备真空采血管, 抽取 8 mL 外周血, 8 h 内将血液标本处理完成。外周血单核细胞 (PBMCs) 采用标准的 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心方法分离。随后将 PBMCs 用无细胞培养基冲洗两次后以全自动血细胞分析仪计数并调整外周血单核细胞至 250 万/mL。取作为 T-SPOT. TB 试剂盒组成部分的预包被有 γ -干扰素单克隆抗体的 96 孔板, 分别接种 25 万个 PBMCs 的混悬液到 4 个孔内。阳性对照加入植物血凝素, 阴性对照仅包含细胞悬液, 将结核分枝杆菌特异多肽抗原 ESAT-6(A) 和 CEP-10(B) 分别加入到另外两个孔内作为刺激原。温箱培养 20 h 后将抗原致敏效应 T 淋巴细胞洗去, 再加入生物素标记的二抗并经酶联显色, 从而使斑点在细胞因子分泌的地方形成, 计数斑点数目。胸腔积液中的单个核细胞 (PEMCs) 的分离: 收集胸腔积液 5~10 mL 加入肝素锂抗凝管混匀, 余操作与 PBMCs 的分离相同。T-SPOT 试剂盒由上海复星科技有限公司提供, 所有操作均严格按照说明书进行。

1.4 T-SPOT. TB 试验结果判读 (1) 空白对照孔斑点数小于 5 个的情况下, 检测孔斑点数减去对照孔斑点数不低于 6 个; (2) 空白对照孔斑点数不低于 6 个的情况下, 检测孔斑点数大于 2 倍的对照孔斑点数。

1.5 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计学软件, 两样本率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本研究中胸腔积液 T-SPOT. TB、外周血 T-SPOT. TB、PPD、抗酸杆菌涂片敏感度分别为 95.2%、80.9%、42.8% 及 11.9%。胸腔积液 T-SPOT. TB、外周血 T-SPOT. TB、PPD 特异度分别为 90.4%、83.3%、54.7%, 胸腔积液及外周血 T-SPOT. TB 检测在诊断结核性胸膜炎敏感度高于 PPD 及抗酸杆菌涂片, 且胸腔积液 T-SPOT. TB 敏感度高于外周血, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 胸腔积液及外周血 T-SPOT. TB 检测特异度高于 PPD, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同指标诊断性能的比较 [% , (n/n)]

指标	PEMCs	PBMCs	PPD	抗酸杆菌涂片
敏感度	95.2(40/42)	80.9(34/42) [△]	42.8(18/42)*	11.9(5/42)*
特异度	90.4(38/42)	83.3(35/42)	54.7(23/42)*	—

[△]: $P < 0.05$, 与 PEMCs 比较; * : $P < 0.05$, 与 PBMCs 比较; —: 无数据。

3 讨 论

胸腔积液是结核性胸膜炎最常见的临床表现之一,与恶性肿瘤胸膜转移及漏出性胸腔积液为临床上胸腔积液常见原因,在中国结核性胸膜炎引起胸腔积液更多见,约占胸腔积液性疾病的一半。相当数量的结核患者缺乏典型临床症状及影像学表现,在与其它疾病鉴别方面存在困难。常用的涂片染色查找抗酸杆菌、血清结核抗体、皮肤结核菌素试验(TST)试验等检查的阳性率均不高,结核菌素试验(PPD)作为结核感染应用最普遍的筛查工具,存在假阳性率高、特异度低等较多的局限性,原因在于 PPD 中使用的纯蛋白衍生物具有某些与卡介苗和环境中的非结核分枝杆菌相同的抗原成分,因而容易产生交叉反应^[7];其次,免疫低下的患者对 PPD 缺乏足够的灵敏度^[8]。镜下找抗酸杆菌的阳性率更低,本研究其敏感度仅为 11.9%,PPD 敏感度和特异度则分别只有 42.8%和 54.7%,因此,研发结核感染的快速诊断方法成为全球结核病防治的重点。

结核性胸膜炎发病机制可能是与结核杆菌直接感染胸膜及机体对结核杆菌或其代谢产物过敏引起。结核性胸膜炎患者胸腔积液结核杆菌培养常为阴性,而在胸腔积液中可找到而由结核菌素刺激产生的 T 细胞^[9],因此,细胞介导免疫反应是结核杆菌感染的重要机制,结核杆菌抗原致敏 T 细胞,这些抗原再次刺激时,活化的效应 T 细胞 CD4、部分 CD8 细胞产生细胞因子-干扰素^[10]。大量研究表明结核抗原特异分泌-干扰素的 T 细胞成为判断结核杆菌感染的可靠标志物。ESAT-6 和 CEP10 同属于一个家族,是最近鉴定的两种低分子量分泌性蛋白,其鉴定为结核感染应用 T 细胞检测技术奠定了基础^[11]。ESAT-6 和 CEP10 只存在于结核分枝杆菌群及其他少数几种致病性分枝杆菌中的蛋白,由结核杆菌基因组 RDI 区相同的操纵子编码。二者体外通过刺激从外周血或胸腔积液分离的单核细胞,计数释放 γ -干扰素的细胞数作为诊断存在结核感染的依据。酶联免疫斑点技术是目前最灵敏的检测 T 细胞反应方法,其与结核特异抗原整合结核感染诊断技术 T-SPOT. TB,通过使用特异度的 ESAT-6 和 CEP10 以降低与 BCG 疫苗和多种环境结核分枝杆菌的交叉反应进而使特异度提高,联合两种抗原多肽制备可使检测的敏感度提高^[12]。T-SPOT. TB 在筛查和检查结核病方面的应用愈加广泛,国外有研究指出,在非结核高风险地区, T-SPOT. TB 检测的敏感度及特异度分别为 90%、93%^[13]。Kang 等^[14]在结核高风险地区的研究显示, T-SPOT. TB 检测的敏感度及特异度分别为 92%及 47%。中国目前关于 T-SPOT. TB 检测研究多采用患者的外周血进行,可是近年来有研究指出结核抗原特异度 T 细胞可能病变部位趋向于集中,因此, T-SPOT. TB 技术也可应用于痰液、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、腹腔积液、脑脊液等的检测^[15-16]。Losi 等^[17]认为 T-SPOT. TB 检测胸腔积液的诊断价值高于外周血。本研究采用 T-SPOT. TB 技术对胸腔积液及外周血中单个核细胞结核杆菌感染进行检测,发现胸腔积液 T-SPOT. TB、外周血 T-SPOT. TB 敏感度分别为 95.2%、80.9%,胸腔积液 T-SPOT. TB、外周血 T-SPOT. TB 特异度分别为 90.4%、83.3%,胸腔积液 T-SPOT. TB 敏感度高于外周血,差异均有统计学意义($P < 0.05$),胸腔积液及外周血 T-SPOT. TB 方法特异度高于 PPD,差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明采用 T-SPOT. TB 技术检测胸腔积液及外周血中单个核细胞结核杆菌感染有助于提高结核性胸膜炎的诊断率,且胸腔积液中单个核细胞 T-SPOT. TB 技术敏感度高于外周血。但是本研究

样本量较小,尚需进一步的大样本研究进行深入探讨。

参考文献

- [1] World Health Organization. WHO global tuberculosis control report 2010. Summary[J]. Cent Eur J Public Health, 2010, 18(4): 237.
- [2] 杨仪,李向炯,翁加豪.不同年龄组结核性胸膜炎的临床特征[J].中华全科医学,2013,11(8):1235-1236.
- [3] 张务敬.结核性胸膜炎合并活动性肺结核 89 例临床分析[J].临床肺科杂志,2007,12(10):1138.
- [4] 李晓非,李冬玲,施巧霞,等.三种检测方法对结核病诊断价值的比较研究[J].实用医技杂志,2008,15(4):451-452.
- [5] 徐德祥,徐峰,林晓燕,等.腺苷脱氨酶与胸腔镜相比对结核性胸腔积液的诊断价值[J].国际呼吸杂志,2013,33(12):897-900.
- [6] 孙家兴,于文成,胡海燕,等.恶性胸腔积液与结核性胸腔积液的诊断进展[J].现代生物医学进展,2013,13(14):2780-2782.
- [7] 张立华,靳文香,贾红彦,等. T-SPOT 与结核菌素试验对结核病患者临床诊断价值[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(14):4107-4108.
- [8] 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]. J Int Med Res. 2007, 35(5): 696-703.
- [9] Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10) [J]. Microbiology, 1998, 144(11): 3195-3203.
- [10] Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 824-828.
- [11] Lee YM, Kim SM, Park SJ, et al. Indeterminate T-SPOT. TB test results in patients with suspected extrapulmonary tuberculosis in routine clinical practice[J]. Infection & chemotherapy, 2013, 45(1): 44-50.
- [12] 郑春华,王立,金燕,等.结核感染 T 细胞斑点试验诊断结核性胸腔积液的临床分析[J].中华医院感染学杂志,2013,23(16): 4078-4080.
- [13] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection; an update [J]. Ann Intern Med, 2008, 149(3): 177-184.
- [14] 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 [J]. Chest, 2007, 132(3): 959-965.
- [15] Strassburg A, Jafari C, Ernst M, et al. Rapid diagnosis of pulmonary TB by BAL enzyme-linked immunospot assay in an immunocompromised host[J]. Eur Respir J, 2008, 31(5): 1132-1135.
- [16] 张秀英,吴若芬,范学文. T-SPOT. TB 法检测脑脊液单个核细胞对结核性脑膜炎早期诊断价值的研究[J].中国现代神经疾病杂志,2013,13(2): 110-115.
- [17] Losi M, Bossink A, Codecasa L, et al. Use of a T-cell interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. Eur Respir J, 2007, 30(6): 1173-1179.

(收稿日期:2015-01-16)