

- lator of azole resistance in *Candida glabrata*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(2):959-967.
- [10] Paul S, Bair TB, Moye-Rowley WS. Identification of genomic binding sites for *Candida glabrata* Pdr1 transcription factor in wild-type and rho0 cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(11):6904-6912.
- [11] 江岑,董丹凤,章黎华,等. PDR1 基因 P927S 突变调节光滑念珠菌对唑类药物耐药的机制[J]. *中华传染病杂志*, 2014, 32(6):325-329.
- [12] Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, et al. Gain of function mutations in CgPDR1 of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(1):e1000268.
- [13] Dunkel N, Liu TT, Barker KS, et al. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upe2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical *Candida albicans* isolate[J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(7):1180-1190.
- [14] Peng Y, Dong D, Jiang C, et al. Relationship between respiration deficiency and azole resistance in clinical *Candida glabrata* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2012, 12(6):719-727.
- [15] Kolaczowska A, Dylag M, Kolaczowski M. Differential expression of the *Candida glabrata* CgRTA1 and CgRSB1 genes in response to various stress conditions[J]. *Biochem biophys Res Commun*, 2013, 432(1):169-174.
- [16] Ferrari S, Sanguinetti M, Torelli R, et al. Contribution of Cg-PDR1-regulated genes in enhanced virulence of azole-resistant *Candida glabrata*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e17589.
- [17] Paul S, Schmidt JA, Moye-Rowley WS. Regulation of the Cg-Pdr1 transcription factor from the pathogen *Candida glabrata* [J]. *Eukaryot Cell*, 2011, 10(2):187-197.
- [18] 沈银忠,卢洪洲,张永信. 耐氟康唑光滑念珠菌 ERG11 基因突变分析[J]. *中华传染病杂志*, 2010, 28(6):331-335.
- [19] Samaranayake YH, Cheung BP, Wang Y, et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata* is associated with increased bud formation and metallothionein production[J]. *J Med Microbiol*, 2013, 62(Pt 2):303-318.
- [20] Whaley SG, Caudle KE, Vermitsky JP, et al. UPC2A is required for high-level azole antifungal resistance in *Candida glabrata*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8):4543-4554.
- [21] Abbes S, Mary C, Sellami H, et al. Interactions between copy number and expression level of genes involved in fluconazole resistance in *Candida glabrata*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013, 11(3):74-79.
- [22] Hosogaya N, Miyazaki T, Nagi M, et al. The heme-binding protein Dap1 links iron homeostasis to azole resistance via the P450 protein Erg11 in *Candida glabrata* [J]. *FEMS Yeast Res*, 2013, 13(4):411-421.
- [23] Nagi M, Tanabe K, Ueno K, et al. The *Candida glabrata* sterol scavenging mechanism, mediated by the ATP-binding cassette transporter Aus1p, is regulated by iron limitation[J]. *Mol Microbiol*, 2013, 88(2):371-381.
- [24] Briones-Martin-del-Campo M, Orta-Zavalza E, Canas-Villamar I, et al. The superoxide dismutases of *Candida glabrata* protect against oxidative damage and are required for lysine biosynthesis, DNA integrity and chronological life survival [J]. *Microbiology*, 2015, 161(Pt 2):300-310.
- [25] Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F, et al. Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(5):1852-1860.

(收稿日期:2015-12-24 修回日期:2016-02-21)

结核感染 T 细胞斑点试验对结核病诊断的研究进展

贾文青 综述 刘莹[△] 审校

(郑州大学第一附属医院呼吸与重症医学科 450052)

关键词: 结核病; 结核感染 T 细胞斑点试验; 结核菌素试验; 诊断价值

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 11. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)11-1519-04

近年来全球结核病疫情呈明显上升趋势,据 WHO 估计全球有 1/3 的人口感染结核分枝杆菌,每年约 800 万新发结核病患者,200 万人死于结核病^[1]。我国是全球结核病高负担国家之一,2010 年全国第 5 次结核病流行病学调查显示,我国现有活动性结核患者 523 万,占全球发病的 14.3%^[2]。早期确诊可以有效控制结核,具有积极的临床意义。传统检测方法:(1)结核分枝杆菌培养法。结核分枝杆菌培养法特异性高,而染色阳性率低,培养需 4~8 周,可延误诊断,影响治疗。(2)痰涂片法。痰涂片法操作简单,但阳性率仅为 30%~60%,因此不利于临

床结核病的诊断和治疗^[3]。(3)组织病理学检查。组织病理学检查是有创性操作,患者依从性差,花费高。(4)结核菌素皮肤试验(TST)。TST 长期应用于结核感染的筛查,存在许多缺陷,因其使用的结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)易与非 MTB 及卡介苗(BCG)发生交叉反应,导致其特异性及敏感度较低。Diel 等^[4]的 Meta 分析报道显示,TST 敏感度仅为 67%~72%。此外 TST 需要 72 h 后出结果,时间长,患者依从性差,且结果判读主观性较强,从而影响结果的准确性。(5)结核血清学检测。结核血清学检测操作简单,用时较少,但存在假阳性和假阴性的问

[△] 通讯作者, E-mail: Liuying03341237@126. com。

题。如果患者存在免疫功能低下或者是处于疾病早期,机体不能产生足够的抗体,就会出假阴性,接种过卡介苗,体内存在一定水平的抗体,可能会出现假阳性。近年来, γ -干扰素释放试验(IGRA)逐渐受到重视,目前全球有 16 个国家陆续将其列入结核病临床应用指南,以协助诊断结核^[5]。IGRA 在我国仍然处于研究阶段,国内常用的方法有 IGRA-ELISA 和结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)。国内很多研究证实,T-SPOT. TB 可以帮助诊断结核病,目前已广泛应用于临床。本文将近几年 T-SPOT. TB 对结核病诊断的临床应用价值进展情况进行分析,综述如下。

1 T-SPOT. TB 简介

T-SPOT. TB 是由酶联免疫斑点法(ELISPOT)发展而来的新型免疫酶技术,ELISPOT 源于 1996 年发现一段存在结核分枝杆菌中名为“结核分枝杆菌差异区 1(RD1)”的基因序列。相对分子质量为 6×10^3 的早期分泌靶向抗原(ESAT-6)和相对分子质量为 10×10^3 的培养滤液蛋白(CFP-10)是结核分枝杆菌 RD1 区编码的相应抗原,该区只存在于结核分枝杆菌复合群和少数致病性分枝杆菌基因组中,所有卡介苗菌株及大多数非致病性分枝杆菌基因组中均缺乏该区域。当机体感染结核分枝杆菌后,体内就会发生细胞免疫,产生特异的效应 T 淋巴细胞,其在体外再次受结核菌特异抗原的刺激时会分泌 γ -干扰素(IFN- γ),通过计数分泌 IFN- γ 的外周血单个核细胞,可以了解机体是否感染结核分枝杆菌。ESAT-6 和 CFP-10 作为特异性抗原刺激机体特异性 T 细胞产生 IFN- γ ,T-SPOT. TB 就是利用 ELISPOT 检测分泌 IFN- γ 的 T 细胞斑点数的技术,1 个斑点代表 1 个效应 T 细胞。目前它是检测抗原特异性 T 细胞最敏感的方法之一,可以检测出 1/100 000~1/50 000 外周血单个核细胞中特异性抗原刺激后释放 IFN- γ 的效应 T 细胞,从而帮助诊断结核。

2 T-SPOT. TB 临床应用进展

2.1 T-SPOT. TB 对肺结核诊断价值 结核病严重危害我国居民的健康,目前结核病的确诊主要依靠涂片、培养找到结核分枝杆菌,但是肺结核患者痰涂片阳性率低,培养所用周期长,影响早期诊断。肺外结核病变部位取材往往比较困难,依据病原学确诊比较困难。菌阴性肺结核及肺外结核患者的快速诊断对临床工作者来说是一项巨大挑战。近几年新兴起来的 T-SPOT. TB 技术所采用的特异性抗原(ESAT-6 与 CFP-10)不存在于卡介苗及绝大多数环境分枝杆菌中,保证了较高的特异性。我国属于卡介苗广泛接种地区,这就使其在我国具有了独特的诊断结核的价值。因此评价 T-SPOT. TB 对肺结核尤其是菌阴肺结核及肺外结核的诊断价值是非常有意义的。Pan 等^[6]报道 T-SPOT. TB 诊断肺结核的阳性率为 91.3%,孙雯雯等^[7]研究认为,T-SPOT. TB 检测技术诊断肺外结核的敏感度在 80.0%以上、特异性在 60.0%以上。其数据差异可能与不同结核感染部位刺激人体产生 IFN- γ 的效应 T 细胞水平不同有关,但不管是肺结核还是肺外结核,T-SPOT. TB 技术都具有较高的敏感度和特异性,可以为临床诊断结核提供依据,是一种重要的免疫学检查方法^[8-9]。符艳等^[10]进一步研究发现,T-SPOT. TB 对诊断活动性结核的阴性预测值很高,而阳性预测值较低,这就提示,当 T-SPOT. TB 值为阴性时,考虑排除结核诊断的可能性大,尤其在免疫功能正常及临床上无结核感染症状的人群,但还是存在一定的假阴性率。目前有研究认为,导致 T-SPOT. TB 假阴性

的危险因素有高龄、体质量超标、入院前较长病程^[6]、接受类固醇治疗^[11]、结核性脑膜炎^[12]等。当患者有上述危险因素时,要考虑是否会存在假阴性的可能。当 T-SPOT. TB 结果为阳性时就需要结合患者临床特征来判断解读其意义,如果患者有过结核感染病史,而目前没有结核感染症状,不能认为患者处于活动性结核的状态。由此可见,虽然 T-SPOT. TB 具有较高的敏感度及特异性,但是仍然需要临床医生对其结果作出慎重的判读。

石慧等^[13]国内学者对结核患者的胸腔积液和外周血分别进行了 T-SPOT. TB 检测,发现其对胸腔积液检测的敏感度和特异性高于外周血。出现这种结果可能是由于结核感染部位存在较多的效应 T 细胞,从而导致外周血效应 T 细胞减少。由此提示,临床工作中必要时可对其感染灶部位的标本,如胸腔积液、腹水、脑脊液、痰液、肺泡灌洗液进行 T-SPOT. TB 检测。另外 T-SPOT. TB 24 h 内出结果,可以早诊断,早治疗,具有良好的应用前景。T-SPOT. TB 有望成为继金标准之外很有效的辅助诊断结核的方法。

2.2 T-SPOT. TB 对免疫抑制患者合并结核的诊断 当机体受到结核分枝杆菌感染时会启动细胞免疫过程,T 细胞在结核病的临床免疫过程中扮演着重要角色。因此免疫力低下特别是细胞免疫力低下的患者 T 细胞功能下降、数量减少,势必会增加机体结核易感率。如糖皮质激素因其强大的抗炎、抗过敏作用广泛应用于临床,但同时又有免疫抑制的作用,可诱导 T 细胞凋亡,抑制抗体生成,此时若受到结核分枝杆菌入侵,易感染而发病。另外高血糖、肿瘤患者生存期延长、HIV 感染等往往也会造成患者免疫功能下降,易导致结核感染,这类患者合并结核感染时其结核中毒症状不明显,有时往往易被原发病掩盖,容易误诊,危及患者生命。传统 TST 由于患者免疫应答被抑制,结核菌素反应减弱,在免疫力低下患者中阳性率仅为 16.7%^[14]。Chen 等^[15]报道 T-SPOT. TB 诊断免疫功能低下患者合并结核感染的敏感度为 77.4%,特异性为 63.1%,可见在免疫功能低下的患者中 T-SPOT. TB 仍然有较高的敏感度,与 TST 相比,T-SPOT. TB 具有较大的优势。HIV 感染/艾滋病(AIDS)患者的细胞免疫功能受到破坏,T 细胞尤其是 CD4⁺ T 细胞明显减少,国际上衡量 HIV 感染患者免疫状态的金标准为 CD4⁺ T 细胞计数。关于该类患者的免疫状态是否会影响 T-SPOT. TB 的结果目前争议比较大,付津平等^[16]对 20 例确诊 HIV 感染/AIDS 合并结核感染的患者进行研究发现,CD4⁺ T 细胞的减少不影响 T-SPOT. TB 结果,T-SPOT. TB 不受免疫状态的影响,这主要是因为 T-SPOT. TB 分离定量的外周血淋巴细胞在一定程度上可避免免疫状态的影响。也有研究认为,HIV 感染/AIDS 患者细胞免疫功能受到严重损害,影响 T-SPOT. TB 的敏感度,导致 T-SPOT. TB 结果易出现假阴性^[17]。出现这种结果的原因可能是因为 HIV 感染/AIDS 患者细胞免疫功能低下,抗原刺激不足以引起有效的免疫应答,ESAT-6 和 CFP-10 的反应受到影响,导致了 T-SPOT. TB 的敏感度降低。目前尚无大规模的研究探讨 T-SPOT. TB 是否受人体免疫状态的影响,这是临床上需要深入研究的问题。

2.3 T-SPOT. TB 对潜伏性和活动性结核的鉴别诊断 目前我国潜伏性结核感染人群数量巨大,新增活动性结核患者每年约 145 万人,控制活动性结核患者必须从控制潜伏性结核感染做起。T 细胞斑点数在一定程度上可反映体内结核分枝杆菌的负荷,结核分枝杆菌负荷越高,刺激机体产生 IFN- γ 的效应 T 细胞

越多,产生斑点数越多,越倾向于活动性结核。鉴于 T-SPOT. TB 检测的斑点形成细胞数与结核活动程度存在一定的正相关趋势,可以期望找到 T-SPOT. TB 的一个界值来区分活动性结核和潜伏性结核感染。Latorre 等^[18]认为,以 T 细胞斑点数作为鉴别活动性结核与潜伏性结核感染的最佳界值为 50。但 Chee 等^[19]的研究表明,T-SPOT. TB 可以帮助诊断结核分枝杆菌感染,然而对是否可以区分活动性还是潜伏性结核感染意义不是很大,这主要是因为 T 细胞斑点数在这两类结核感染中有较大范围重叠。引起这种现象的原因可能是因为对潜伏性结核感染者来说其免疫功能较好,较少的抗原刺激就激发出活跃的保护性免疫,其 T-SPOT. TB 值高,而对活动性结核患者来说其免疫功能低下,大量的抗原刺激也不足以激起有效的细胞免疫,其 T-SPOT. TB 值就会降低。是否可以将 T-SPOT. TB 检测技术应用于潜伏性和活动性结核的鉴别仍然需要临床采集大量标本进行研究。

2.4 T-SPOT. TB 对结核治疗效果监测的价值 当结核患者接受抗结核药物治疗时,临床医生目前主要依靠患者临床症状及影像学检查来评估疗效,但是这两种方法主观性太强。最近研究表明,T-SPOT. TB 有望成为抗结核疗效观察的客观指标。T-SPOT. TB 反应性主要受抗原载量、宿主免疫状态的影响,但具体哪个因素对 T-SPOT. TB 结果影响较大,目前还少有研究。直观来看,不考虑患者免疫因素是当结核患者接受抗结核药物治疗时,由于效应 T 细胞存活期比较短,一般在结核杆菌被消灭后可迅速减少,T-SPOT. TB 反应性也会随之降低,因而斑点数结果可出现下降甚至阴性的结果,因此 T-SPOT. TB 可定量监测抗结核治疗效果。Wilkinson 等^[20]对结核病患者进行了研究,发现在抗结核治疗 1 年后 T-SPOT. TB 斑点数明显下降,55% 的患者甚至转为阴性。但是,一些胞内结核抗原可能会在机体循环中释放出来,很难确定抗结核治疗是否会减少 T-SPOT. TB 斑点数值。普遍认为,T-SPOT. TB 斑点数值代表分泌 IFN- γ 的效应 T 细胞数量,斑点数反映了机体是否受过结核分枝杆菌的感染,与机体的细胞免疫功能直接相关。T-SPOT. TB 的斑点数与效应 T 细胞呈对应关系,即 1 个斑点数可以代表 1 个效应 T 细胞,但结核杆菌与效应 T 细胞即斑点数之间是否有对应关系,对于这其中的机制研究并不是很清楚。在这种机制不是很清楚的情况下,如果认为 T-SPOT. TB 可以监测抗结核治疗预后是有些草率。而且国外有研究发现,活动性结核患者往往合并有免疫功能低下,当行抗结核治疗一段时间后免疫功能较前恢复,此时结核效应 T 细胞增多,导致 T-SPOT. TB 结果增高^[21]。Adetifa 等^[22]研究发现,对未接受治疗的潜伏结核感染者在不同时间进行 T-SPOT. TB,发现斑点数有自然下降的规律。因此,目前虽然没有足够的证据表明 T-SPOT. TB 可以作为一种结核治疗的监测方法,但可以认为 T-SPOT. TB 对结核治疗效果评价及患者的预后还是有一定的提示意义。未来 T-SPOT. TB 动态检测是否可用于评价患者对抗结核治疗的反映,还需要更大规模、更全面的临床研究加以阐明。

3 结 语

和传统的 TST 比较,T-SPOT. TB 不受机体免疫状态、卡介苗接种的影响,T-SPOT. TB 是从单细胞水平进行检测,可及时捕获细胞分泌于表面的细胞因子,在检测结核分枝杆菌感染方面具有较高的敏感度和特异性,能够在短时间内帮助快速诊断结核病,在预防、控制和辅助诊断结核病方面具有重要意义。T-

SPOT. TB 优势在于直接检测人体细胞因子分泌细胞,具有较高的敏感度和特异性。T-SPOT. TB 有助于肺内、肺外结核的诊断,在不同结核中诊断价值不同,但总的来说 T-SPOT. TB 对于结核的诊断有很好的辅助价值。虽然目前根据 T-SPOT. TB 结果还不能完全判定是潜伏性还是活动性结核感染,但通过斑点数可以提供鉴别依据。T-SPOT. TB 目前在临床上已经逐步开始广泛应用,但也存在一定的假阳性与假阴性,临床医生可以将其作为一个参考指导下一步诊断及治疗,但是不能盲目依赖其结果,需要结合患者的具体临床情况综合作出判断。此外 T-SPOT. TB 价格昂贵,操作复杂,限制了它在经济落后地区的使用。

综上所述,T-SPOT. TB 是诊断结核的一种具有广泛应用前景的免疫学方法,但仍然需要更多大规模、针对不同人群的研究来验证。今后需要对 T-SPOT. TB 的临床应用价值进行更科学准确的评价,从而得出 T-SPOT. TB 对结核病诊断最有效的应用原则,更好地利用 T-SPOT. TB 辅助结核的诊断。

参考文献

- [1] Stein CM, Baker AR. Tuberculosis as a complex trait: impact of genetic epidemiological study design[J]. Mamm Genome, 2011, 22(1/2): 91-99.
- [2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-580.
- [3] Druszczyńska M, Kowalewicz-Kulbat M, Fol M, et al. Latent M. tuberculosis infection-pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies[J]. Pol J Microbiol, 2012, 61(1): 3-10.
- [4] Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a meta-analysis [J]. Chest, 2010, 137(4): 952-968.
- [5] 尹青琴, 申阿东. 不同国家 γ 干扰素释放试验临床应用指南的概述[J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(21): 1663-1666.
- [6] Pan L, Jia H, Liu F, et al. Risk factors for false-negative T-SPOT. TB assay results in patients with pulmonary and extra-pulmonary TB[J]. J Infect, 2015, 70(4): 367-380.
- [7] 孙雯雯, 肖和平, 吴福蓉, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在临床诊断为肺外结核患者中的价值评价[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(7): 784-789.
- [8] Fan L, Chen Z, Hao XH, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(3): 456-466.
- [9] Zhong L, Zhou XL, Li J, et al. The T-SPOT. TB Test for Diagnosis of Breast Tuberculosis[J]. Lab Med, 2015, 46(1): 14-19.
- [10] 符艳, 蒋正华. 结核免疫斑点试验与结核菌素试验在活动性结核病诊断中的优越性对比[J]. 中国医刊, 2015, 44(8): 54-57.
- [11] Liao CH, Lai CC, Tan CK, et al. False-negative results by

enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma among patients with culture-confirmed tuberculosis[J]. J Infect, 2009, 59(6): 421-423.

[12] Lee YM, Park KH, Kim SM, et al. Risk factors for false-negative results of T-SPOT. TB and tuberculin skin test in extrapulmonary tuberculosis [J]. Infection, 2013, 41(6): 1089-1095.

[13] 石慧, 崔丽英. 结核感染 T 细胞斑点试验诊断结核性胸膜炎的应用价值[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2015, 8(2): 51-54.

[14] 万荣, 汪亚玲, 祈燕伟, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在 HIV/AIDS 合并结核感染诊断中的应用[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(7): 138-141.

[15] Chen J, Zhang R, Wang J, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e26827.

[16] 付津平, 可春梅. T 细胞酶联免疫斑点试验与结核抗体平行检测 HIV 感染/AIDS 合并结核感染比较[C]. // 中华医学会, 中国性病艾滋病防治协会. 第四届全国艾滋病临床影像学术会议暨第二届全国感染及传染影像学最新进展学术会议论文集. 郑州, 2011.

[17] Karam F, Mbow F, Fletcher H, et al. Sensitivity of IFN-gamma release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS progression [J]. PLoS One, 2008, 3(1): e1441.

[18] Latorre I, De Souza-Galvao M, Ruiz-Manzano J, et al. Quantitative evaluation of T-cell response after specific antigen stimulation in active and latent tuberculosis infection in adults and children [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009, 65(3): 236-246.

[19] Chee CB, KhinMar KW, Gan SH, et al. Tuberculosis treatment effect on T-cell interferon-gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens [J]. Eur Respir J, 2010, 36(2): 355-361.

[20] Wilkinson KA, Kon OM, Newton SM, et al. Effect of treatment of latent tuberculosis infection on the T cell response to Mycobacterium tuberculosis antigens [J]. J Infect Dis, 2006, 193(3): 354-359.

[21] Ferrand RA, Bothamley GH, Whelan A, et al. Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9(9): 1034-1039.

[22] Adetifa IM, Ota MO, Jeffries DJ, et al. Interferon-gamma ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 439-445.

(收稿日期: 2016-01-20 修回日期: 2016-02-27)

• 综 述 •

乙型肝炎病毒相关性肾炎实验室检查方法研究进展

郝小康 综述, 郭瑞林 审校

(陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712000)

关键词: 乙型肝炎; 肾炎; 临床实验室检查

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)11-1522-04

乙型肝炎(下称乙肝)病毒相关性肾炎(HBV-GN)是 HBV 诱发的肾小球肾炎, 由于我国 HBV 感染较高, 人群中 HBV 携带率高达 10%, 由此引起的肾脏损害亦非常常见。史文丽等^[1]研究显示, HBV-GN 约占肾活检 0.25%。HBV-GN 的发病机制较为复杂, 涉及多种学说: 包括免疫复合物介导、HBV 直接感染肾脏、HBV 诱发的自身免疫、免疫缺陷、遗传因素等^[2]。目前国内在 HBV-GN 的诊断上还有待深入讨论, 而国外由于 HBV 感染的低发生率, 没有制定相应的标准, 现在很多医院临床大夫仍在沿用 1989 年 HBV-GN 座谈会制定的初步诊断标准^[3]。2001 年全国肾活检病理诊断研讨会制定了 HBV-GN 诊断标准^[4]: 通过免疫组化方法在肾小球内检测出 HBV 抗原(HBV-Ag)阳性, 方可诊断为 HBV-GN。2004 年黎磊石院士也提出了关于 HBV-GN 的诊断标准。由于一些学者在血清 HBV 标志物阴性儿童的肾脏中检测到 HBV 标志物, 并且结合临床表现可以诊断 HBV-GN, 所以修订了 HBV-GN 的标准^[5-6]。多数学者认为, 肾组织中 HBV 抗原阳性的患者, 结合肾脏典型病理表现, 可以诊断为 HBV-GN, 而对于血

清 HBV-Ag 阳性, 肾组织 HBV-Ag 阴性的患者则不能诊断 HBV-GN。所以肾组织 HBV 标志物的检测对于 HBV-GN 的诊断意义重大。HBV 标志物在肾脏中的检测一直存在问题, 实验室关于肾组织 HBV 标志物的检测, 目前主要包括免疫荧光法、免疫组织化学法(下称免疫组化法)、核酸分子检查这 3 种方法, 现将这 3 种实验室检查方法原理及优缺点综述如下。

1 免疫荧光法

1961 年 Dixon 开始在肾脏疾病中应用免疫荧光技术, 对肾脏病的病理诊断提供了重要帮助。肾组织中 HBV-Ag 的检测主要采用间接免疫荧光法, 即先用鼠抗人一抗与 HBV-Ag 反应, 形成复合物, 然后用荧光素标记的羊抗鼠二抗与复合物反应, 发出荧光, 在荧光显微镜下观察。目前实验室免疫荧光的检查主要是通过冰冻切片组织和石蜡切片组织来完成。冰冻切片免疫荧光具有操作时间短, 步骤简单, 组织抗原保护好等优点^[7]。但是冰冻间接免疫荧光染色要求实验人员做到: (1)切割后的新鲜肾组织要迅速放入含有生理盐水的一次性塑料管中, 随后放至冰冻切片机内, 进行包埋切片; (2)免疫荧光