

酶联免疫斑点法在涂阴结核病人快速诊断中应用*

李海¹, 郑春燕², 杨莉¹, 王剑¹

摘要:目的 评价酶联免疫斑点技术(ELISPOT)在涂阴结核病人快速诊断中的临床应用价值。方法 应用 ELISPOT 技术检测 30 例涂阳结核病人、106 例涂阴结核病人和 71 例非结核对照者外周血单个核细胞的 γ 干扰素(INF- γ),同时对 14 例涂阳结核病人、105 例涂阴结核病人和全部 71 例对照者实施结核菌素皮肤实验(TST),计算灵敏度和特异度。结果 涂阳和涂阴结核组的 ELISPOT 灵敏度分别为 96.7% 和 88.7%,TST 灵敏度分别为 78.6% 和 65.7%,2 组 ELISPOT 灵敏度、TST 灵敏度间差异均无统计学意义($P > 0.05$);涂阳结核组 ELISPOT 灵敏度与 TST 灵敏度间差异无统计学意义($P > 0.05$);涂阴结核组 ELISPOT 灵敏度高于 TST 灵敏度,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.83, P < 0.001$);对照组中 ELISPOT 特异度为 84.5%,高于 TST 特异度的 59.2%,差异有统计学意义($\chi^2 = 11.28, P = 0.001$);对照组接种卡介苗和未接种卡介苗者 ELISPOT 特异度分别为 88.5% 和 73.3%,差异无统计学意义($P > 0.05$);对照组接种卡介苗者 TST 特异度为 38.5%,低于未接种卡介苗者的 71.1%,差异有统计学意义($\chi^2 = 7.27, P = 0.007$)。结论 ELISPOT 可作为临床实践中涂阴结核病的辅助诊断技术,有助于结核病人得到更快速的诊断和治疗。

关键词:酶联免疫斑点技术(ELISPOT);结核菌素皮肤实验(TST);涂阴结核病人;快速诊断

中图分类号: R 725.6; R 446.6

文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)04-0478-04

Application of enzyme-link immunospot assay in rapid diagnosis of sputum smear-negative tuberculosis

LI Hai*, ZHENG Chun-yan, YANG Li, et al (* Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China)

Abstract: Objective To evaluate the usefulness of enzyme-link immunospot assay (ELISPOT) in the diagnosis of sputum smear-negative tuberculosis. **Methods** Totally 30 tuberculosis patients with sputum smear-positive, 106 tuberculosis patients with sputum smear-negative, and 71 non-tuberculosis patients were enrolled. The interferon-gamma (INF- γ) produced by peripheral blood mononuclear cells of all participants was detected by ELISPOT, and parts of participants were performed with tuberculin skin test (TST) simultaneously. **Results** The sensitivity of ELISPOT in patients with sputum smear-positive (96.7%, 29/30) was higher than that of patients with sputum smear-negative (88.7%, 94/106), without significant difference ($\chi^2 = 0.925, P > 0.05$). The sensitivity of TST in patients with sputum smear-positive (78.6%, 11/14) were higher than that of patients with sputum smear-negative (65.7%, 69/105) with no significant difference ($\chi^2 = 0.925, P > 0.05$). In patients with sputum smear-negative, the specificity of ELISPOT was higher than that of TST with significant difference ($\chi^2 = 15.83, P < 0.001$). However, in control group, the sensitivity of ELISPOT (84.5%, 60/71) was higher than that of TST (59.2%, 42/71) with significant difference ($\chi^2 = 11.28, P = 0.001$), and the specificity of ELISPOT in controls with Bacille Calmette Guerin (BCG) vaccination (73.3%, 33/45) was higher than that of patients without BCG vaccination with no significant difference ($P > 0.05$), while the specificity of TST in controls with BCG vaccination (38.5%, 10/26) was lower than that of patients without BCG vaccination (71.1%, 32/45) with significant difference ($P = 0.007$). **Conclusion** The ELISPOT is an supplementary mean for the diagnosis of sputum smear-negative tuberculosis in clinical practice. It would be helpful for the rapid diagnosis and treatment for the patients.

Key words: enzyme-link immunospot assay; tuberculin skin test; sputum smear-negative TB patient; rapid diagnosis

结核病是导致高发病率和死亡率最重要的单一感染性疾病^[1]。中国属全球 22 个结核病高负担国家之一,结核病人数在世界排名第二,约 258 万人患有结核病,发病率为 194/10 万,每年因结核病死

亡的人数约有 20 万^[2]。目前,细菌学检查是结核病实验室诊断的金标准,特异性高,但合适的痰液标本不易获得,在发达国家,即使有良好的微生物学检测设备,也只有约 50% 的结核病例得到细菌学检查的证实^[2],导致很多细菌学检查阴性的结核病例得不到及时的诊断和治疗。近年来,以酶联免疫斑点试验(enzyme-link immunospot assay, ELISPOT)检测外周血中结核特异性的释放 γ 干扰素(interferon- γ , INF- γ) 诊断结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染的方法在低发病率的发达国家得以广泛应用,并显示了较高的灵敏度与特异度^[1]。本研

* 基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0993003C-3); 广西医学科学实验中心开放基金专项项目(KFJJ2010-28); 广西研究生教育创新计划资助项目(2011105981002D24)

作者单位: 1. 广西医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学教研室,广西南宁 530021; 2. 广西医科大学基础医学院免疫学教研室

作者简介: 李海(1979-),男,广西桂平人,主管医师,博士,研究方向:结核病诊断技术。

通讯作者: 杨莉, E-mail: yangli8290@hotmail.com

究以 ELISPOT 技术检测阳性、阴性结核病人和非结核病人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的 IFN- γ , 并与传统的结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test, TST)结果比较, 评价 ELISPOT 技术在涂阴结核病人诊断中的临床应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象 整群抽取 2011 年 3—8 月在广西南宁市第四人民医院结核病区住院, 符合卫生部肺结核诊断标准^[3], 且痰涂片抗酸杆菌(acid fast bacillus, AFB)检查阳性的 30 例结核病人作为涂阳结核组。选择同期在该医院结核病区住院, 且 ≥ 3 次痰涂片 AFB 检查阴性的 106 例结核病人作为涂阴结核组, 这些病人均为曾接受过诊断性抗感染治疗, 经 β -内酰胺类、新大环内酯类抗生素治疗无效后经试验性抗结核治疗病情好转者。所有结核病例均经纤维支气管镜检查或经皮肤组织病理学活检证实的初治患者, 化疗疗程均 < 14 d。选择在该医院内科住院治疗的 71 例非结核病人作为对照组, 对照组患者均无结核病人接触史、无结核病症状(≥ 1 个月咳嗽、发热、气喘或近期体重下降 > 10 kg)、胸部摄片无结核病灶。所有研究对象均为未应用免疫抑制剂, 且无艾滋病病毒和急性病毒感染以及严重肝肾功能衰竭等病史者。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查 由经过培训的临床医生采用自行调查问卷收集所有研究对象的人口学特征、卡介苗接种史、与结核病人的接触史、以往结核的诊断和治疗、病情和治疗等情况。

1.2.2 ELISPOT 检测 采用 T 细胞斑点试剂盒(英国牛津免疫公司)检测研究对象的外周血单个核细胞的 IFN- γ , 实验操作根据试剂盒说明书进行。应用酶联斑点分析仪计(德国 AID 公司)数着色的斑点, 即斑点形成细胞数(Spot Forming Cells, SFCs)。当阴性对照孔斑点数为 0~5 时, 检测孔点数减去阴性对照孔点数 ≥ 6 , 可判断所检测标本为阳性; 当阴性对照孔点数 ≥ 6 , 任意 1 个检测孔点数为阴性对照孔 2 倍, 可判断所检测标本为阳性^[1]。

1.2.3 TST 检测 用 0.1 mL(5 Tu)的结核菌素纯蛋白衍生物(protein purified derivative, PPD)(RT23, 成都生物制品所, 生产批号: 20101043-3)左前臂掌侧前 1/3 皮肤无瘢痕部位皮内注射, 出现 7~8 mm 大小圆形橘皮样皮丘为宜。72 h 后测量硬结横纵直径(mm), 其平均值作为 PPD 皮试大小。以硬结平均直径 < 5 mm 或无反应为阴性, ≥ 5 mm 为阳性^[4]。

1.3 统计分析 采用 Excel 2003 建立数据库, 应用 SPSS 17.0 软件进行一般描述性分析、非参数检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般情况 30 例涂阳结核组病人年龄 22~76 岁, 平均年龄(48.03 \pm 16.96)岁; 其中男性 18 例, 占 60.0%, 女性 12 例, 占 40.0%; 居住在城市 11 例, 占 36.7%, 农村 19 例, 占 63.3%; 文化程度小学及以下 6 例, 占 20.0%, 中学及以上 24 例, 占 80.0%; 家庭月收入 < 1 000 元 10 例, 占 33.3%, ≥ 1 000 元 20 例, 占 66.7%; 卡介苗接种者 10 例, 占 33.3%; 既往有结核病史者 3 例, 占 10.0%; 免疫力抑制者 4 例, 占 13.3%。106 例涂阴结核组病人年龄 15~89 岁, 平均年龄(48.43 \pm 23.90)岁; 其中男性 52 例, 占 49.1%, 女性 54 例, 占 50.9%; 居住在城市 62 例, 占 58.5%, 农村 44 例, 占 41.5%; 文化程度小学及以下 27 例, 占 25.5%, 中学及以上 79 例, 占 74.5%; 家庭月收入 < 1 000 元 31 例, 占 29.2%, ≥ 1 000 元 75 例, 占 70.8%; 卡介苗接种者 32 例, 占 30.2%; 既往有结核病史者 23 例, 占 21.7%; 免疫力抑制者 12 例, 占 11.3%。71 例对照组非结核病人年龄 4~84 岁, 平均年龄(44.92 \pm 22.47)岁; 其中男性 38 例, 占 53.5%, 女性 33 例, 占 46.5%; 居住在城市 37 例, 占 52.1%, 农村 34 例, 占 47.9%; 文化程度小学及以下 19 例, 占 26.8%, 中学及以上 52 例, 占 73.2%; 家庭月收入 < 1 000 元 11 例, 占 15.5%, ≥ 1 000 元 60 例, 占 84.5%; 卡介苗接种者 26 例, 占 36.7%; 既往有结核病史者 9 例, 占 12.7%; 免疫力抑制者 5 例, 占 7.0%。3 组研究对象不同特征比较, 性别、年龄、居住地、文化程度、家庭月收入、卡介苗接种史、既往结核病史、免疫力抑制间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 ELISPOT 检测结果 涂阳结核组、涂阴结核组和对照组比较, 3 组 SFCs 中位数差异有统计学意义($H = 81.583, P < 0.001$)。涂阳和涂阴结核组 ESAT-6 形成的 SFCs 数(中位数 92 个/ 2.5×10^5 PBMCs 和 74 个/ 2.5×10^5 PBMCs)分别与对照组(中位数 9 个/ 2.5×10^5 PBMCs)比较, 差异均有统计学意义($P < 0.001$); 涂阳和涂阴结核组 CFP-10 形成的 SFCs 数(中位数 150 个/ 2.5×10^5 PBMCs 和 100 个/ 2.5×10^5 PBMCs)分别与对照组(中位数 7 个/ 2.5×10^5 PBMCs)比较, 差异均有统计学意义($P < 0.001$); 涂阳结核组 ESAT-6、CFP-10 形成的 SFCs 中位数与涂阴结核组比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 TST 检测结果(表 1) 涂阳结核组、涂阴结

核病组和对照组比较,3 组 TST 硬结直径大小差异有统计学意义($\chi^2 = 14.474, P = 0.001$);涂阳和涂阴结核组 TST 硬结直径大小比较,差异无统计学

意义($P > 0.05$);涂阳和涂阴结核组硬结直径分别与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 不同组别病人 TST 硬结直径大小分布

组别	TST 硬结直径 (mm)								合计	
	<5		5~9		10~20		>20			
	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%	例数	%
涂阳结核组	2	14.3	7	50.0	5	35.7	0	0.0	14	100.0
涂阴结核组	37	35.2	28	26.7	35	33.3	5	4.8	105	100.0
对照组	43	60.6	27	38.0	1	1.4	0	0.0	71	100.0

2.4 ELISPOT 和 TST 诊断灵敏度与特异度比较
涂阳和涂阴结核组的 ELISPOT 灵敏度分别为 96.7% (29/30) 和 88.7% (94/106), TST 灵敏度分别为 78.6% (11/14) 和 65.7% (69/105), 2 组 ELISPOT 灵敏度、TST 灵敏度间差异均无统计学意义($P > 0.05$);涂阳结核组 ELISPOT 灵敏度与 TST 灵敏度间差异无统计学意义($P > 0.05$);涂阴结核组 ELISPOT 灵敏度高于 TST 灵敏度,差异有统计学意义($\chi^2 = 15.83, P < 0.001$)。对照组中 ELISPOT 特异度为 84.5% (60/71), 高于 TST 特异度的 59.2% (42/71), 差异有统计学意义($\chi^2 = 11.28, P = 0.001$)。

2.5 对照组 ELISPOT 和 TST 阳性结果与卡介苗接种关系(表 2) 对照组接种卡介苗和未接种卡介苗者 ELISPOT 特异度分别为 88.5% (23/26) 和 73.3% (33/45), 接种卡介苗和未接种卡介苗者 ELISPOT 特异度间差异无统计学意义($P > 0.05$);接种卡介苗者 TST 特异度为 38.5% (10/26), 低于未接种卡介苗者的 71.1% (32/45), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.27, P = 0.007$)。

表 2 对照组 ELISPOT 和 TST 阳性结果与卡介苗接种关系

方法		接种卡介苗		未接种卡介苗		χ^2 值	P 值
		例数	%	例数	%		
ELISPOT	+	3	21.5	12	26.7	2.26	0.132
	-	23	88.5	33	73.3		
TST	+	16	61.5	13	28.9	7.27	0.007
	-	10	38.5	32	71.1		

3 讨论

TST 是目前快速诊断活动性结核病和潜伏性结核感染的唯一手段^[5],但 TST 在免疫受抑制的病人中灵敏度降低^[6],且在卡介苗接种人群和感染环境中非结核分枝杆菌的人群中特异度降低^[7]。本研究结果表明,虽然在涂阳结核组中,TST 与 ELISPOT 灵敏度间无明显差异,但涂阴结核组中,

ELISPOT 灵敏度 (88.7%) 高于 TST 灵敏度 (65.7%),提示 ELISPOT 诊断涂阴结核病人的价值高于 TST。

本研究中 ELISPOT 的特异度为 84.5%, 低于国外报道的 92%^[3],可能的原因是 ELISPOT 不能很好区分活动性结核病患者和潜伏性结核感染者^[1,8],而中国人群的全年龄组结核感染率约为 44.5%^[9],即使没有明确的暴露史也有可能感染了结核分枝杆菌,因而不可避免地降低了 ELISPOT 的特异度。ELISPOT 检测基于 RD1 编码的 ESAT-6 和 CFP-10 为特异性抗原,其在卡介苗和大部分环境分枝杆菌中缺失,因此具有高度特异性^[7]。本研究表明,ELISPOT 特异度 (84.5%) 高于 TST 特异度 (59.2%);接种卡介苗者 ELISPOT 特异度与未接种卡介苗者无明显差异,而接种卡介苗者 TST 特异度低于未接种卡介苗者,提示 ELISPOT 的高特异度为卡介苗接种者的活动性结核病诊断提供了更为可靠的检测手段。

综上所述,在临床诊断困难的涂阴结核病人中,ELISPOT 具有较高的灵敏度和特异度,其检测结果的临床参考意义高于 TST,作为辅助诊断技术有助于结核病人得到更快速的诊断和治疗。

参考文献

- [1] Kang YA, Lee HW, Hwang SS, et al. Usefulness of whole-blood interferon- γ assay and interferon- γ enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis [J]. Chest, 2007, 132(3): 959-965.
- [2] WHO. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing; WHO report 2009 [R]. Geneva: WHO, 2009.
- [3] 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.
- [4] 中华人民共和国卫生部. WS288-2008 肺结核诊断标准 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [5] Barnes PF. Diagnosing latent tuberculosis infection: the 100-year upgrade [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 807-808.
- [6] Passalenti L, Khan K, Richardson R, et al. Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT TB test, tuberculin skin test, and an expert phys-

- Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, et al. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunosorbent assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice [J]. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, 2005, 24(8): 529-536.
- Goletti D, Vincenti D, Carrara S, et al. Selected RD1 peptides for active tuberculosis diagnosis; comparison of a gamma interferon whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay and an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2005, 12(11): 1311-1316.
- Wu X, Zhang L, Zhang J, et al. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin test antigen for the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008, 152(1): 81-87.

收稿日期: 2012-05-20

(郭薇编辑 郑新校对)

· 专题报道之四 ·

肺结核病新患者发现延误及影响因素分析

陈松华, 王晓萌, 钟节鸣, 陈彬, 黄玉

摘要:目的 了解浙江省新发肺结核患者发现延误的影响因素, 为肺结核的早期控制提供科学依据。方法 采用回顾性研究方法收集浙江省 2009 年 1 月 1 日—12 月 31 日确诊登记的 31 287 例新发肺结核患者病案资料, 分析患者发现延误的影响因素。结果 浙江省新发肺结核患者就诊延误、诊断延误和发现延误时间中位数分别为 17、1 和 21 d, 就诊延误、诊断延误和发现延误率分别为 55.66%、7.06% 和 62.91%; 多因素 logistic 回归分析结果表明, 羁押人群、发现地区地形为山地/岛屿、涂阳和重症患者是浙江省新发肺结核患者发现延误的危险因素; 男性、15~59 岁、学生/儿童、教师/医务人员/职员、服务行业人员、其他职业人员、省外流动户籍、患者来源为健康检查/转诊/追踪、发现地区地形为盆地/丘陵、诊治单位为定点医院是浙江省新发肺结核患者发现延误的保护因素。结论 新发肺结核患者就诊延误时间明显较诊断延误长; 性别、年龄、职业、户籍、是否羁押人群、患者来源、发现地区地形、诊治单位类型、诊断结果、是否重症是浙江省新发肺结核患者发现延误的影响因素。

关键词: 就诊延误; 诊断延误; 新发患者; 肺结核; 影响因素

中图分类号: R 521

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0481-04

Factors associated with diagnostic delay for primary pulmonary tuberculosis patients in Zhejiang province

CHEN Song-hua, WANG Xiao-meng, ZHONG Jie-ming, et al (Department of Tuberculosis Control, Zhejiang Provincial Centre for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang Province 310051, China)

Abstract: **Objective** To explore the impact factors of diagnostic delay for primary pulmonary tuberculosis (TB) patients, and to provide basis for early control of tuberculosis. **Methods** With retrospective design, the information for 31 287 primary (TB) cases were collected from medical records from January 1 to December 31, 2009 to analyze the impact factors of diagnostic delay. **Results** The median of patient delay, doctor diagnostic delay, total patient delay time was 17 days, 1 day, and 21 days and the rate of patient delay, doctor diagnostic delay, total patient delay was 55.7%, 7.1%, and 62.9%, respectively. Logistic regression analyses showed that risk factors for diagnostic delay included female, children and elderly, with low-income occupation, having treatment of other diseases, living in island or mountainous area, being diagnosis and treatment in public health institution, smear-positive cases, severe cases, and detention individuals. The protective factors for diagnostic delay included male, young and adults, with high-income occupation, floating population, taking physical examination and referral track in plain or basin areas, having diagnosis and treatment in the fixed hospital, smear-negative cases, and minor cases. **Conclusion** The patient delay time is significantly longer than doctor diagnostic delay time. The impact factors of diagnostic delay for primary pulmonary tuberculosis patients included gender, age, occupation, household, being detention individual, patient source, living area, type of treatment and diagnosis institution and the state of TB.

Key words: patient delay; diagnostic delay; primary patient; pulmonary tuberculosis; impact factor

结核患者的早发现、早诊断和早期规则治疗是控制结核病疫情的关键。在许多发展中国家, 结核病发现延误较为普遍, 可以增高患者的病死率及疾病在社区传播的危险性^[1-2]。而患者发现延误主

要可以归咎于患者就诊延误(患者首次结核症状与到医疗机构就诊时间差)和医生诊断延误(就诊至确诊的时间差)。为了解浙江省新发肺结核患者发现延误的影响因素, 为肺结核的早期控制提供科学依据, 本研究采用回顾性研究方法收集浙江省 2009 年 1 月 1 日—12 月 31 日确诊登记的 31 287 例新发肺结核患者病案资料, 分析患者发现延误的影响因

作者单位: 浙江省疾病预防控制中心结核病防制所, 杭州 310051

作者简介: 陈松华(1975-), 男, 浙江东阳人, 副主任医师, 硕士, 主要从事传染病预防控制工作。