

T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 检测 在结核诊断中的应用

熊宗年¹ 张雪芹¹ 陈艳¹

[摘要] **目的:**比较 γ -干扰素释放实验(T-SPOT. TB)和 GeneXpertMTB/RIF 2 种方法对结核病的诊断价值。**方法:**采集 273 例结核病患者与 45 例健康对照者全血,采用 T-SPOT. TB 检测结核特异性抗原致敏 T 淋巴细胞,同时收集结核病患者痰液标本采用抗酸染色法进行抗酸杆菌筛查、GeneXpertMTB/RIF 进行 MTB-DNA 和利福平(RIF)耐药检测。**结果:**273 例结核病患者中抗酸染色、T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 的敏感性分别为 26.74%(73/273)、89.74%(245/273)和 72.53%(198/273),特异性分别为 100%、93.33%和 100%,阳性预测值分别为 100%、98.79%和 100%,阴性预测值分别为 18.37%、60.00%和 37.50%,准确性分别为 37.11%、90.25%和 76.42%,3 种方法的敏感性差异有统计学意义($\chi^2 = 248.39, P < 0.01$)。3 种方法对肺结核的检出率分别为 34.76%(73/210)、90.00%(189/210)和 94.29%(198/210),差异有统计学意义($\chi^2 = 234.937, P < 0.01$)。3 种方法对肺外结核的检出率分别为 0(0/63)、88.88%(56/63)和 0(0/63)。抗酸染色阳性的肺结核患者中 T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 的阳性率分别为 93.15%(68/73)和 100%(73/73),抗酸染色阴性肺结核患者 T-SPOT. TB 和 GeneXpert MTB/RIF 的阳性率为 88.32%(121/137)和 91.24%(125/137)。**结论:**T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 2 种方法对诊断结核病和肺结核的诊断效能明显优于抗酸染色,T-SPOT. TB 对肺外结核患者有更高的检出率。

[关键词] γ -干扰素释放实验;T-SPOT. TB; GeneXpertMTB/RIF;结核病;诊断效能

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.10.012

[中图分类号] R521 **[文献标志码]** A

Comparision of IFN- γ release assays and GeneXpertMTB/RIF test in diagnosis of tuberculosis

XIONG Zongnian ZHANG Xueqin CHEN Yan

(Zhongxiang Hospital of Traditional Chinese Medicine,Zhongxiang, 431900,China)

Corresponding author:XIONG Zongnian,E-mail:44060680@qq.com

Abstract Objective: To evaluate and compare the clinical application of interferon- γ release assays (IGRA) and GeneXpertMTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis. **Method:** A total of 273 cases of tuberculosis and 45 healthy controls were enrolled. Direct smear of sputum was used with Ziehl-Neelsen acid-fast bacilli staining to detect tubercle bacillus. T-SPOT. TB was conducted to examine the specific T lymphocytes of tuberculosis. GeneXpertMTB/RIF was operated strictly following the manufacturer's instructions. **Result:** The sensitivity of acid-fast bacilli staining, T-SPOT. TB and GeneXpertMTB/RIF was 26.74%, 89.74% and 72.53% ($\chi^2 = 234.937, P < 0.01$), respectively. The specificity was 100%, 93.33% and 100%, respectively. The positive value (PPV) was 100%, 98.79% and 100%, respectively. The negative predictive value (NPV) was 18.37%, 60.00% and 37.50%, respectively. The accuracy was 37.11%, 90.25% and 76.42%, respectively. The positive rate of three methods was 34.76%, 90.00% and 94.29% in pulmonary tuberculosis ($\chi^2 = 248.39, P < 0.01$), while 0, 88.88% and 0 in extrapulmonary tuberculosis. In addition, the positive rate of T-SPOT. TB and GeneXpertMTB/RIF in acid-fast staining positive pulmonary tuberculosis was 93.15% and 100%, while 88.32% and 91.24% in acid-fast staining negative pulmonary tuberculosis. **Conclusion:** T-SPOT. TB and GeneXpertMTB/RIF might have higher diagnosis efficiency than acid-fast staining and could be useful in evaluating tuberculosis infection. T-SPOT. TB may be better than GeneXpertMTB/RIF in extrapulmonary tuberculosis diagnosis.

Key words IFN- γ release assays; T-SPOT. TB; GeneXpertMTB/RIF; tuberculosis; diagnosis efficiency

结核病是长期严重威胁全世界人民健康的重

大传染病之一。据 WHO 2016 年全球结核病报告,2015 年世界范围内估计有 1 040 万新发结核病病例,其中肺结核约 610 万,估计仍有约 430 万的病例未被发现和报告。2000—2015 年全球的结核

¹钟祥市中医院(湖北钟祥,431900)
通信作者:熊宗年,E-mail:44060680@qq.com

病控制机构和政府相关部门通过各种方法,有效避免了近 4 900 万人因结核病死亡,但随着人口流动性增大、结核杆菌多重耐药株增多、结核并发 HIV 感染、儿童结核感染增多等其他社会问题的出现,全球结核病防控工作仍然形势严峻。该报告也指出,我国的新发病例总数仍然居全球前 3 位,全球范围内结核病的诊断和治疗方面的缺口还很大,为实现全球结核病防治目标,各国需要大力加紧预防、检测和治疗结核病。

目前,临床实验室对结核病的诊断方法可以分为细菌学(痰涂片和培养)、免疫学和分子生物学检测。细菌学检查中常规的抗酸染色方法敏感性较低,传统的培养耗时长、液体培养成本高且仪器昂贵难以普及,并且这些细菌学检查对肺外结核病的诊断阳性率非常低,难以满足临床对结核病早期诊断和治疗的需要。免疫学检测无需活细胞培养和特殊仪器设备、操作简便并且结果显示快速,是对疾病进行早期诊断的一种非常理想的方法。但在结核病的免疫学诊断方法中寻求灵敏度高、特异性强抗原似乎并不容易,因此至今还没有一种抗原或抗体的检测方法可以替代结核病痰涂片镜检,WHO 也不建议使用抗原或抗体的检测作为结核杆菌的诊断实验。2000 年以后逐渐有分子诊断方法被应用于结核病的临床诊断,如线性探针技术(LiPA)、DNA 微阵列芯片技术、探针熔解曲线技术以及 Gene XpertMTB/RIF 技术等等。近年来,通过中国疾控结核病国家参比实验室的论证和推广,不少新的诊断方法在临床诊断中得以应用,大大缩短了报告时间,其中包括免疫学检测 γ -干扰素释放实验(interferon- γ release assays, IGRA)和分子诊断技术 Gene XpertMTB/RIF,但二者对结核并的诊断价值及应用前景尚需进一步数据证实。

1 资料与方法

1.1 研究对象

结核病患者 273 例,其中男 194 例,女 79 例;平均(40.12±17.22)岁,全部为我院结核科住院患者。所有入选病例治疗时间均<1 周,经临床或细菌学检查确诊^[1],其中肺结核患者 210 例,肺外结核(包括结核性胸膜炎、结核性脑膜炎、皮肤结核以及淋巴结核)患者 63 例。对照组为 45 例健康体检者,男 29 例,女 16 例;平均年龄(39.01±13.34)岁,排除各种原发性、继发性免疫缺陷性疾病(如放/化疗患者、接受免疫抑制剂治疗患者以及并发糖尿病患者),从而避免受试者因免疫功能损害所致的假阴性。

1.2 主要试剂和设备

γ -干扰素释放实验试剂盒 T-SPOT. TB 购自英国 Oxford Immunotec Ltd. 公司;Gene XpertMTB/RIF 试剂盒和仪器购自美国 Cepheid 公司;

抗酸染色液购自珠海贝索生物科技有限公司。其他设备:二氧化碳培养箱(美国 SHEL LAB 公司),BHC-II B2 二级生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司),RT-2600C 全自动洗板机(深圳 Rayto 公司)等。

1.3 抗酸染色(ACB 染色)

用接种环挑取痰液中干酪样坏死小块或带血小块,制成厚涂片,干燥后固定。将制备好的涂片进行石炭酸复红溶液染色约 20 min;3%盐酸乙醇脱色至红色脱净;然后亚甲蓝溶液复染约 5 min,置油镜下观察。结果判断:未脱色细菌呈红色为抗酸性细菌,脱色经复染呈蓝色的细菌为非抗酸性细菌。

1.4 Gene XpertMTB/RIF 检测

按照 1:2 的比例在痰液标本中加入处理液,然后将其放置在涡旋振荡器上涡旋 15~30 s,室温下孵育 10 min,再涡旋震荡 15~30 s,然后室温下再孵育 5 min,待标本完全液化。然后将制备好的样本加入到样品盒中,将样品盒放入到 Gene Xpert 仪器中。结果判断:① MTB 未检出:阴性结果;② MTB 检出,RIF Resistance 未检出;③ MTB 检出,RIF Resistance 检出。

1.5 T-SPOT. TB 检测

采用 BD 公司肝素钠抗凝管抽取研究对象静脉血 5 ml,于室温储存和运输,4 h 内提取外周血单个核细胞(PBMCs)并计数,严格按照试剂盒 T-SPOT. TB 说明书操作。根据试剂盒说明书进行结果判断:放大镜下观察斑点数量,平皿上 1 个斑点=1 个效应 T 细胞。同批实验中空白对照斑点数 0~5 个,阳性对照 PHA 上斑点数 ≥ 6 个,测试孔上斑点数 ≥ 6 个判断为阳性。

1.6 统计学分析

用 SPSS 17.0 进行,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗酸染色、T-SPOT. TB 和 Gene XpertMTB/RIF 对结核病患者诊断

用抗酸染色, T-SPOT. TB 和 Gene XpertMTB/RIF 分别对 210 例肺结核病患者和 63 例肺外结核患者分别进行统计分析,发现 3 种方法对肺结核的检出率为 34.76%(73/210),90.00%(189/210)和 94.29%(198/210),对肺外结核的检出率分别为 0(0/63),88.89%(56/63)和 0(0/63)。此外, Gene XpertMTB/RIF 还检测出 13 例利福平耐药,占 MTB DNA 阳性的 6.57%。

抗酸染色、T-SPOT. TB 和 Gene XpertMTB/RIF 对结核病患者诊断效能见表 1。经 χ^2 检验发现,抗酸染色、T-SPOT. TB 和 Gene XpertMTB/RIF 3 种方法对结核病诊断的敏感性差异有统计学意义($\chi^2=248.39, P<0.01$),对肺结核病患者诊断

表 1 3 种方法对于结核病诊断效能的比较 %

方法	结核病患者 阳性/例(%)	健康对照组 阳性/例(%)	敏感性	特异性	PPV%	NPV%	准确性
AFB	73(26.74)	0	26.74	100	100	18.37	37.11
T-SPOT. TB	245(89.74)	3(6.67)	89.74	93.33	98.79	60.00	90.25
Gene XpertMTB/RIF	198(72.53)	0	72.53	100	100	37.50	76.42

的检出率差异也有统计学意义($\chi^2=234.937, P<0.01$)。T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 的诊断效能明显优于抗酸染色。

2.2 T-SPOT. TB 对抗酸染色阳性和阴性的肺结核和肺外结核患者的检测效果

AFB 阳性的肺结核患者中 T-SPOT. TB 阳性率为 93.15% (68/73), AFB 阴性肺结核患者 T-SPOT. TB 阳性率为 88.32% (121/137); 63 例肺外结核患者 T-SPOT. TB 阳性率为 88.88% (56/63)。AFB 阳性的肺结核患者中 Gene XpertMTB/RIF 阳性率为 100% (73/73), AFB 阴性肺结核患者 Gene XpertMTB/RIF 阳性率为 91.24% (125/137); 63 例肺外结核患者 Gene XpertMTB/RIF 阳性率为 0(0/63)。经 χ^2 检验发现, T-SPOT. TB 和 Gene XpertMTB/RIF 对 AFB 阳性和阴性肺结核患者检出率差异无统计学意义, 而 2 种方法对肺外结核患者的检出率差异有统计学意义($\chi^2=100.80, P<0.01$)。因此, T-SPOT. TB 对肺外结核患者有更高的检出率。

3 讨论

IGRA 的原理是基于结核感染者体内存在特异的效应 T 淋巴细胞, 当效应 T 淋巴细胞再次接触到结核特异性抗原刺激时会分泌 IFN- γ , 通过检测 IFN- γ 就可以对结核病或结核潜伏感染者进行辅助诊断^[2-3]。IGRA 方法中, 采用了 MTB 基因组 RD1 区域的 2 个结核特异性抗原 ESAT-6 和 CFP-10, 避免了 BCG 接种和绝大多数的环境分枝杆菌 (也不存在 RD1 区) 的影响, 因此对结核病的诊断具有较好的敏感性和特异性^[4-6]。Gene XpertMTB/RIF 是一个可以进行标本处理、实时 PCR 和利福平耐药性检测的完整平台, 痰标本可以直接放入模块中, 直接采用 GeneXpert 设备进行标本液化、去污染、富集、DNA 提取、实时扩增以及应用分子灯塔进行 rpoB 耐药基因检测。该操作平台完全自动化, 简单又安全, 非常适用于现场大规模筛查。WHO 于 2014—2016 年曾利用 Gene XpertMTB/RIF 对尼日利亚的结核病高流行和高死亡地区进行现场筛查, 结果发现 20.83% (973/4671) 的人群检测出 MTB-DNA^[7]。WHO 也强烈推荐 Xpert MTB/RIF 在结核高负担国家用于怀疑 MDR-TB 的患者、以及 HIV 并发结核患者的最初诊断。

本研究结果显示, 抗酸染色、T-SPOT. TB 与

Gene XpertMTB/RIF 相比较敏感性分别为 26.74%、89.74% 和 72.53%, 特异性分别为 100%、93.33% 和 100%, 阳性预测值分别为 100%、98.79% 和 100%, 阴性预测值分别为 18.37%、60.00% 和 37.50%, 准确性分别为 37.11%、90.25% 和 76.42%。这些结果表明, T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 2 种方法对诊断结核病和肺结核的诊断效能明显优于抗酸染色。特别要指出的是, GeneXpertMTB/RIF 的特异性、阳性预测值特别高, 因此若是该检测阳性基本不排除 MTB 感染。进一步数据分析显示, 抗酸染色、T-SPOT. TB 与 Gene XpertMTB/RIF 对肺结核的检出率分别为 34.76%、90.00% 和 94.29%, 对肺外结核的检出率分别为 0、88.88% 和 0, T-SPOT. TB 对肺外结核的检出率明显高于抗酸染色和 Gene XpertMTB/RIF。此外, 抗酸染色阳性的肺结核患者中 T-SPOT. TB 和 GeneXpertMTB/RIF 的阳性率为 93.15% 和 100%, 抗酸染色阴性肺结核患者 T-SPOT. TB 和 Gene XpertMIB/RIF 的阳性率分别为 88.32% 和 91.24%, T-SPOT. TB 分别对肺外结核的检出率明显高于 Gene XpertMTB/RIF。虽然统计学上来讲, 因为样本例数的关系 Gene XpertMTB/RIF 和 T-SPOT. TB 对抗酸染色阳性、阴性肺结核的检出率差异无统计学意义, 但对肺结核患者来说 Gene XpertMTB/RIF 无疑是一种非常好的方法。

因此, T-SPOT. TB 和 Gene XpertMTB/RIF 都可以作为结核病非常有效的辅助诊断方法, 未来在临床实验室中都具有广泛的应用前景。建议检验医师在筛选结核病的实验室诊断方法时, 要针对不同类型的结核病患者采取个性化的诊断方法, 在对肺结核的诊断上推荐使用 Gene XpertMTB/RIF, 而对肺外结核来讲推荐使用 T-SPOT. TB。

参考文献

[1] 中华医学会. 临床诊疗指南-结核病分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1-46, 122.

[2] Alfred A, Lardizabal MD, Lee B, et al. Interferon-gamma release assay for detection of tuberculosis infection [J]. US Respiratory Disease, 2006, 54: 59-61.

[3] Wagstaff AJ, Zellweger JP. T-SPOT. TB; an in vitro diagnostic assay measuring T-cell reaction to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens[J]. Mol Diagn Ther, 2006, 10: 57-63.

某医院 5 年来临床用血情况分析

胡佳林¹ 周浩锋²

【摘要】 目的:通过对近几年来某医院用血情况的统计分析,指导临床合理用血。**方法:**对 2011—2015 年该院总用量、人均用量、手术台均用量、季度用量、各血型红细胞用量以及内外科用量进行回顾性分析。**结果:**成分输血率在 99.9% 以上,人均用量和手术台均用量呈逐年下降趋势,总的用量尤其血浆年均均为负增长,冷沉淀凝血因子、血小板的年均均为正增长,每年第 3 季度用量最多,第 1 季度用量最少,不同血型红细胞用量 O>A>B>AB,临床红细胞用量血型构成比与正常人群血型分布不成正比,外科用量多于内科。**结论:**医院应根据自身用血特点,制定合理的用血计划,开展规范化的用血管理。

【关键词】 成分输血;临床用血;合理用血

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2017.10.013

【中图分类号】 R457.1 **【文献标志码】** A

Analysis on clinical blood transfusion status in one hospital for five years

HU Jialin¹ ZHOU Haofeng²

(¹Department of Transfusion, Fuling Central Hospital, Chongqing Municipality, Chongqing, 408099, China; ² Fuling District of Chongqing City Center Blood Station)

Abstract Objective: To guide reasonable clinical blood usage by analyzing the clinical component blood usage in current situation. **Method:** Total, quarterly, per capita, each surgery, each red blood cell type, internal medicine and surgical use of blood were retrospectively analyzed in our hospital from 2011 to 2015. **Result:** The rate of component blood transfusion accounted for 99.9% or more. Per capita, and each surgery use of blood were declining trend year by year. Use of total blood especially plasma were negative growth. Cryoprecipitate and platelets were positive growth. Use of blood was most every year the 3rd quarter and least in the first quarter. The consumption of blood in each blood type was O>A>B>AB. Clinical dosage of red blood cells, blood type composition ratio was out of step with normal blood type distribution. Surgery was more than internal medicine in use of blood. **Conclusion:** According to the characteristics of using blood in our hospital, we should make the plan of reasonable use and carry out the standardization of blood usage and management.

Key words blood component transfusion; blood for clinical use; reasonable blood use

输血作为临床上一种非常重要的医疗救治手

段,具有其他任何药物都不能代替的疗效,在现代医学中发挥着重要的作用。目前,全国许多地方均出现了血源紧张的报道,为了更好地加强临床用血

¹重庆市涪陵中心医院输血科(重庆,408099)

²重庆市涪陵区中心血站

- [4] Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177: 1164—1170.
- [5] Pai M, Behr M. Latent mycobacterium tuberculosis infection and interferon-gamma release assays [J]. Microbiol Spectr, 2016, 4.
- [6] Santin M, García-García JM, Domínguez J, et al.

Guidelines for the use of interferon- γ release assays in the diagnosis of tuberculosis infection [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2016, 34: 303. e1—e13.

- [7] Ochang EA, Udoh UA, Emanghe UE, et al. Evaluation of rifampicin resistance and 81-bp rifampicin resistant determinant region of rpoB gene mutations of Mycobacterium tuberculosis detected with Xpert-MTB/Rif in Cross River State, Nigeria [J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5: S145—S146.

(收稿日期:2017-02-08)