

应用酶联免疫斑点试验检测入伍新兵结核潜伏感染

梁 艳, 吴雪琼, 王 兰, 王志耘, 张翠英, 阳幼荣, 张俊仙

(解放军第 309 医院全军结核病研究所军队结核病防治重点实验室, 北京 100091)

[摘 要] **目的** 应用酶联免疫斑点试验(ELISPOT)检测入伍新兵结核潜伏感染情况, 评价 ELISPOT 在检测结核潜伏感染中的价值。**方法** 以结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)皮肤试验为对照, 应用 ELISPOT 试剂盒检测 366 例 2009 年驻京部队入伍新兵外周血中分泌结核菌抗原特异性 γ 干扰素(IFN- γ)的 T 淋巴细胞数。对 PPD 和 ELISPOT 均为阴性的入伍新兵接种卡介苗, 10 个月后再做 PPD 皮肤试验和 ELISPOT, 比较结果。**结果** 366 例入伍新兵中, PPD 皮肤试验和 ELISPOT 阳性率分别为 44.81% 和 31.69%。202 例 PPD 皮肤试验阴性和 164 例 PPD 皮肤试验阳性者中, 分别有 53 例(26.24%)和 63 例(38.41%) ELISPOT 阳性, 两者的一致率为 57.92% (212/366), 两者的检测结果差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.34, P < 0.001$)。在接种过卡介苗者中, PPD 皮肤试验阳性率为 58.53% (127/217), ELISPOT 阳性率为 29.03% (63/217), 斑点形成细胞数为 32.44 ± 26.52 ; 在未接种卡介苗者中, PPD 皮肤试验阳性率为 24.83% (37/149), ELISPOT 阳性率为 35.57% (53/149), 斑点形成细胞数为 41.81 ± 30.48 。110 例 PPD 和 ELISPOT 均为阴性的入伍新兵接种卡介苗 10 个月后, PPD 皮肤试验阳转率为 78.18%, 而 ELISPOT 检测均为阴性。**结论** ELISPOT 具有较高的特异性和敏感性, 能真实反映入伍新兵的结核潜伏感染情况, 可推广应用。

[关 键 词] 结核; 结核分枝杆菌; 潜伏感染; 酶联免疫斑点试验; 重组 CFP-10/ESAT-6 融合蛋白; 结核菌素试验; 纯蛋白衍生物; 卡介苗

[中图分类号] R52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)04-0244-04

Investigation on latent tuberculosis infection in the new recruits with enzyme-linked immunospot assay

LIANG Yan, WU Xue-qiong, WNAG Lan, WANG Zhi-yun, ZHANG Cui-ying, YANG You-rong, ZHANG Jun-xian (Army Tuberculosis Key Laboratory, Tuberculosis Research Institute, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective** To study the latent tuberculosis infection (LTBI) in the new recruits with enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT), and evaluate the value of ELISPOT on the detection of LTBI. **Methods** A total of 366 new recruits were intradermally injected with purified protein derivative (PPD), and detected with ELISPOT assay with recombinant CFP-10/ESAT-6 fusion protein (rCFP-10/ESAT-6) as a stimulus. New recruits who were ELISPOT- and PPD-negative were vaccinated by intradermal injection with Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine, they were detected by PPD skin test and ELISPOT assay again 10 months later. **Results** Among 366 new recruits, the positive rate of PPD skin test and ELISPOT assay was 44.81% and 31.69%, respectively. Of 202 PPD-negative and 164 PPD-positive new recruits, 53 (26.24%) and 63 (38.41%) were ELISPOT positive, respectively, overall consistency between two tests was 57.92% (212/366), the difference was statistically significant ($\chi^2 = 14.34, P < 0.001$). Among new recruits with BCG vaccination, PPD- and ELISPOT-positive rate was 58.53% (127/217) and 29.03% (63/217) respectively, spot forming cell (SFC) were 32.44 ± 26.52 ; Among new recruits without BCG vaccination, PPD- and ELISPOT-positive rate was 24.83% (37/149) and 35.57% (53/149) respectively, SFC were 41.81 ± 30.48 . 78.18% of 110 new recruits vaccinated by BCG vaccine 10 months later were PPD-

[收稿日期] 2011-01-05

[基金项目] 国家重大传染病专项基金资助(2008ZX-10003-001)

[作者简介] 梁艳(1969-), 女(汉族), 山东省肥城市人, 副主任医师, 主要从事结核病基础研究。

[通讯作者] 吴雪琼 E-mail: amy5919@sina.com

positive, but all of them were ELISPOT-negative. **Conclusion** ELISPOT technique has high specificity and sensitivity for screening TB infection.

[Key words] tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; latent infection; enzyme-linked immunospot assay; recombinant CFP-10/ESAT-6 fusion protein; tuberculin skin test; purified protein derivative; Bacillus Calmette-Guerin

[Chin Infect Control, 2011, 10(4): 244-247]

结核病(tuberculosis, TB)一直是人们关注的一个全球性健康问题。据世界卫生组织(WHO)估计,全球约有 1/3 人口受到结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)感染,全世界每年都有新发结核病例 830 万以及死亡病例 180 万^[1]。我国肺结核的发病率位于世界第 2 位,每年新增 TB 患者约 150 万,受感染人数约 5.5 亿^[2]。结核潜伏感染(latent tuberculosis infection)通常是指体内存在结核杆菌,但未出现明显的临床症状且痰中也无结核菌,PPD 试验呈阳性^[3]。然而到目前为止,对结核潜伏感染的诊断并无很好的手段。免疫学检查常用的是结核菌素纯蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD)皮肤试验,但由于与卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)存在交叉反应,其特异性较差^[4]。酶联免疫斑点试验(enzyme linked-immunospot assay, ELISPOT)是一个新的建立于 T 细胞基础上的 γ 干扰素(IFN- γ)释放试验,对结核感染有较好的特异性和敏感性^[5]。本研究应用结核分枝杆菌重组 CFP-10/ESAT-6 融合蛋白为刺激剂建立 ELISPOT 新方法,检测入伍新兵结核分枝杆菌抗原特异性 IFN- γ 效应 T 细胞数,从而对入伍新兵结核潜伏感染的现状进行调查,以发现高危人群,为军队 TB 的预防与控制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 2009 年驻京部队入伍新兵 366 例,均为男性,年龄 18~23 岁,平均年龄(19.14 ± 1.39)岁;常规胸部 X 线检查均为阴性。

1.2 PPD 皮肤试验 吸取 0.1 mL BCG PPD(50 IU/mL),采用曼图氏法注射于前臂掌侧皮内。于注射后 72 h 检查注射部位反应,并观察卡痕。硬结的横径及纵径的平均数 ≥ 5 mm 为阳性, ≥ 20 mm 为强阳性。

1.3 ELISPOT 方法 采用上海铭源数康生物芯片有限公司的结核分枝杆菌效应 T 细胞检测试剂盒,按说明书操作,简述如下。

1.3.1 外周血单个核细胞(PBMC)分离及计数 取 4~5 mL 肝素抗凝血,用淋巴细胞分离液分离提取单个核细胞,调节细胞浓度至 2.5×10^6 /L。

1.3.2 分泌 IFN- γ 的 T 细胞检测 每份测试样本做 3 孔(微孔板),阴性对照孔内加入无血清培养基 50 μ L;阳性对照孔内加入阳性对照植物血凝素(PHA)50 μ L;测试孔内加入 rCFP-10/ESAT-6 融合蛋白 50 μ L。分别在上述各孔内加 100 μ L(含有 2.50×10^5 个 PBMC)细胞悬液,将微孔板置于 37°C 含 5%CO₂ 的孵箱中孵育 20 h;弃培养上清,洗板后在每孔中加入 100 μ L 生物素标记 IFN- γ 检测抗体(1:200 稀释),置 37°C 孵育 1 h;洗板后加入 100 μ L 链亲合素-碱性磷酸酶(1:200 稀释),置 37°C 孵育 30 min;洗板后每孔加入 100 μ L 底物液(BICP/NBT),置 37°C 闭光显色 7~15 min,可见板底显示蓝紫色斑点;中止反应后,用酶联斑点分析仪计数着色的斑点,每一个点代表一个分泌 IFN- γ 的 T 细胞。当阴性对照孔斑点数 < 13 ,检测孔斑点数减去阴性对照孔斑点数 ≥ 13 ;或阴性对照孔斑点数 ≥ 13 ,检测孔斑点数为阴性对照孔斑点数 2 倍,可判定所检测标本为阳性。

1.4 BCG 接种方法 现用 BCG 为 5 人份/支的冻干剂型,使用前加入 0.5 mL 注射用水,静置 1 min,待溶解后,充分摇匀。接种部位为左上手臂三角肌外下缘,用 75%乙醇消毒后待干,皮内注射 BCG 0.1 mL^[6]。

1.5 统计分析 检测孔斑点数减去阴性对照孔斑点数的结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SAS 6.12 软件处理数据,定性资料采用配对研究设计的 R \times C 表假设检验;定量资料采用方差分析;两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 入伍新兵 PPD 皮肤试验结果 366 例入伍新兵中,PPD 皮肤试验阳性 164 例(44.81%),PPD 平均直径 ≥ 15 mm 者 34 例(9.29%),详见表 1。

表 1 366 例入伍新兵 PPD 皮肤试验结果

Table 1 Results of PPD skin test in 366 new recruits

Average diameter of PPD (mm)	No. of cases	Positive rate(%)
<5	202	0.00
5 -	130	35.52
15 -	27	7.38
20 -	7	1.91

2.2 入伍新兵 ELISPOT 检测结果 366 例入伍新兵中,ELISPOT 阳性者 116 例,阳性率 31.69%。

2.3 入伍新兵 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测结果比较 在 164 例 PPD 皮肤试验阳性者中,63 例(38.41%)为 ELISPOT 阳性,101 例为 ELISPOT 阴性;在 202 例 PPD 皮肤试验阴性者中,53 例(26.24%)为 ELISPOT 阳性,149 例为 ELISPOT 阴性;两者的一致率为 57.92%(212/366),两者的检测结果差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.34, P < 0.001$)。详见表 2。

2.4 BCG 接种对 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测

结果的影响 根据手臂上是否有卡痕判断是否接种了 BCG。366 例入伍新兵中,217 例(59.29%)有卡痕,其中 127 例(58.53%)PPD 皮肤试验阳性,平均直径为(11.09 ± 4.10)mm;63 例(29.03%)为 ELISPOT 阳性,斑点形成细胞数(SFC)为 32.44 ± 26.52。149 例(40.71%)无卡痕者中,37 例(24.83%)PPD 皮肤试验阳性,平均直径为(11.89 ± 4.29)mm;53 例(35.57%)为 ELISPOT 阳性,SFC 为 41.81 ± 30.48。详见表 3。

表 2 366 例入伍新兵 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测结果比较(例)

Table 2 Comparison between ELISPOT assay and PPD skin test in 366 new recruits(case)

PPD skin test	ELISPOT		
	Negative	Positive	Total
Negative	149	53	202
Positive	101	63	164
Total	250	116	366

表 3 BCG 接种对入伍新兵 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测结果的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of BCG vaccination on PPD skin test and ELISPOT assay in new recruits($\bar{x} \pm s$)

BCG	PPD skin test	PPD skin test diameter		ELISPOT	
		No. of cases	Diameter (mm)	No. of cases	SFC value
Vaccination	Positive	127	11.09 ± 4.10	63	32.44 ± 26.52
	Negative	90	0.90 ± 1.59	154	4.46 ± 3.50
	Total	217	6.86 ± 6.01	217	12.59 ± 19.31
Non-vaccination	Positive	37	11.89 ± 4.29	53	41.81 ± 30.48*
	Negative	112	0.51 ± 1.21	96	4.00 ± 3.60
	Total	149	3.34 ± 5.47	149	17.19 ± 25.61*

* Comparison with BCG-vaccinated persons, $P < 0.05$

2.5 PPD 和 ELISPOT 均为阴性的入伍新兵接种 BCG 10 个月后 PPD 皮肤试验阳转率和 ELISPOT 检测结果比较 110 例 PPD 和 ELISPOT 均为阴性的人入伍新兵接种 BCG 10 个月后,86 例 PPD 皮肤试验阳性,阳转率为 78.18%;而 ELISPOT 检测均为阴性。

3 讨论

TB 是一种慢性呼吸道传染病,病程长,恢复慢,对人体损害大,特别是其能通过空气传播等特点,对生活、工作高度集中的部队人群具有较大的威胁性。目前,通过检测结核菌抗原特异性 IFN- γ 水平来诊断结核感染已经被越来越多的学者所接受。该技术最大的优势在于:一方面能显著增加检测的

敏感性和特异性,另一方面能区分结核菌感染和 BCG 接种引起的免疫应答反应。但是由于结核菌抗原特异性 IFN- γ 检测的进口商品化试剂盒(TS-POT-TB 和 Quantiferon-TB-Gold)价格昂贵,限制了该类技术在我国的应用。因此,建立和评价敏感、特异、价廉的结核感染诊断方法对结核感染进行筛查,具有更加迫切的现实意义。

本研究采用结核分枝杆菌效应 T 细胞检测试剂盒对 2009 年驻京部队 366 例入伍新兵进行检测,同时以 PPD 皮肤试验为对照,了解入伍新兵的结核感染情况,同时评价 ELISPOT 技术在检测结核潜伏感染中的应用价值。研究发现,366 例入伍新兵的 PPD 皮肤试验阳性率为 44.81%,与 2006 年的 49.9% [7] 和 2007 年的 41% [8] 相近;而 ELISPOT 的阳性率只有 31.69%,显著低于 PPD 皮肤试验

阳性率($\chi^2 = 13.33, P = 0.00$)。在 202 例 PPD 皮肤试验阴性和 164 例 PPD 皮肤试验阳性者中, 分别有 53 例(26.24%)和 63 例(38.41%)ELISPOT 阳性, 两者的一致率为 57.92%, 但两者的检测结果差异具有统计学意义($P < 0.001$), 这与以往的报道^[9-10]相一致, PPD 试验与 ELISPOT 无相关性。

同时研究也发现, 在接种过 BCG 者中, PPD 皮肤试验阳性率为 58.53%, ELISPOT 阳性率为 29.03%; 在未接种过 BCG 者中, PPD 皮肤试验阳性率为 24.83%, ELISPOT 阳性率为 35.57%。前者说明 ELISPOT 的特异性比 PPD 皮肤试验高, 后者说明 ELISPOT 的敏感性比 PPD 皮肤试验好。

我们对 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测均为阴性的入伍新兵采取了预防策略——接种 BCG, 10 个月后再进行 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测, 发现 PPD 皮肤试验阳转率为 78.18%, 而 ELISPOT 检测均为阴性。这一结果再次证明了接种 BCG 可致 PPD 皮肤试验阳性, 同时也说明 ELISPOT 检测技术具有较好的特异性。我们对 PPD 平均直径 ≥ 15 mm 或 ELISPOT 阳性的新兵将监测 18~24 个月, 以及时发现发展为活动性结核者, 尽早给予治疗。

总之, 我们的研究表明, ELISPOT 具有较高的特异性和敏感性, 能更真实反映驻京部队入伍新兵的结核潜伏感染情况。ELISPOT 的普及和推广, 对于部队乃至全国的 TB 预防和控制工作具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. WHO report 2005-Global tuberculosis control; surveillance, planning, financing[J]. NZ Med J, 2006, 119(1230): 1899.
 - [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[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 3-7.
 - [3] 吴雪琼, 张宗德, 乐军. 分枝杆菌分子生物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 115-125.
 - [4] Anderden P, Doherty T M, Pai M, *et al.* The prognosis of latent tuberculosis; can disease be predicted? [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(5): 175-182.
 - [5] Mazurek G H, Jereb J, Lobue P, *et al.* Guidelines for using the QuantiFERON-TB-Glod test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States [J]. MMWR Recomm Rep, 2005, 54(RR-15): 49-55.
 - [6] 中华人民共和国卫生部. 计划免疫技术管理规程[S]. 北京, 1987.
 - [7] Zhang C, Dong E, Zhu L, *et al.* Tuberculosis infection survey in new recruits to the army in Beijing (2003-2006) [J]. J Prev Med Chin PLA, 2007, 25(3): 188-189.
 - [8] Wu X, Li Q, Yang Y, *et al.* Latent tuberculosis infection among new soldiers in Chinese army; comparison of ELISPOT assay and tuberculin skin test [J]. Clin Chim Acta, 2009, 405(1-2): 110-113.
 - [9] Kang Y A, Lee H W, Yoon H I, *et al.* Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis burden country [J]. JAMA, 2005, 293(22): 2756-2761.
 - [10] Farhat M, Greenaway C, Pai M, *et al.* False-positive tuberculin skin tests; what is the absolute effect of BCG and non-tuberculosis mycobacteria? [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(11): 1192-1204.
-
- (上接第 243 页)
- [8] Munk M E, Arend S M, Brock I, *et al.* Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]. J Infect Dis, 2001, 183(1): 175-176.
 - [9] Wu X, Yang Y, Zhang C, *et al.* Latent tuberculosis infection among new recruits to the Chinese army; comparison of ELISPOT assay and tuberculin skin test [J]. Clin Chim Acta, 2009, 405(1-2): 110-113.
 - [10] Meier T, Eulenbruch H P, Wrighton-Smith P, *et al.* Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24(8): 529-536.
 - [11] Ferrara G, Losi M, D'Amico R, *et al.* Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*; a prospective study [J]. Lancet, 2006, 367(9519): 1328-1334.
 - [12] Lalvani A, Pathan A A, Durkan H, *et al.* Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen specific T cells [J]. Lancet, 2001, 357(9273): 2017-2021.