

物的摄入量、体育锻炼、吸烟情况等方面,量化且较全面地评估生活方式干预对身体质量的影响。通过对比可以看出,经过健康生活方式教育,人们从膳食结构、摄入量、运动量等方面还是积极趋向于合理化和健康化的。主要表现为肉食及肉制品摄入量减少(从日均 131.63g 减少到 92.44g, $P < 0.01$),新鲜蔬菜水果的摄入量增加(从日均 406.47g 增加到 524.27g, $P < 0.01$),主食摄入量合理增加(从日均 238.87g 增加到 514.3g, $P < 0.05$),运动时间增加(从日均 23.01min 增加到 38.34min, $P < 0.05$)。这种变化也导致了人体质量向好的方面发展,主要表现为肺活量、柔韧性、反应速度、身体质量综合评分的提高上($P < 0.05$)。但同时也看出,健康教育也有难以应对的难题,就是人们的习惯。10 余年甚至数十年养成的习惯,无论是好习惯还是坏习惯,想在短期内仅靠自我约束和自我革新,有时的确不容易。例如吸烟的问题,油、盐摄入过量的问题,前后对比无明显变化($P > 0.05$),说明这些问题仅靠自觉控制有一定难度,还需要全社会共同探索切实可行的监控方法。

从身体质量的改善来看,生活方式的调整不见得能改善所有的体质指标。部分身体素质指标,如握力、闭眼单脚站立时间,仅靠增加蔬菜水果摄入量、控烟、增加有氧运动这种生活方式的调整,是难以提高成绩的($P > 0.05$),需要有针对性地进行专门训练才

行。尽管如此,健康合理的生活方式能增强体质,这一点是毋庸置疑的。

不良生活方式对人健康的影响,是多方面的。不仅表现在恶性肿瘤、心脑血管疾病、糖尿病、高血压、肥胖症高发等方面,还表现在器官功能减退,身体各部位功能退化,以及抑郁、焦虑等心理问题多发等方面。同样地,不良生活方式对人的身体质量也会产生负面影响。因此,要积极培养健康合理的生活方式,自觉摒弃不良生活习惯,才是健康的决定因素。

参考文献

- 1 张东秀,任波,何学华,等.黔南地区大学生生活方式与体质状况调查研究[J].黔南民族师范学院学报,2009,6:38-39
- 2 江崇民.国民体质测定标准知识问答[M].北京:中国标准出版社,2007:18-138
- 3 中国营养学会.中国居民膳食指南[M].西藏:西藏人民出版社,2010:3-54
- 4 吴俊心.健康生活方式对大学生体质的影响——以山西师范大学为例[J].搏击·体育论坛,2011,3(10):3-7
- 5 王文辉.大学生体质现状及因素分析[J].皖西学院学报,2009,25(2):142-144
- 6 王丽娟.高科技时代加强体育锻炼的必要性探究[J].科协论坛,2010,8:191-192
- 7 钱振宇.生活方式对体质健康状况的影响[J].科技信息,2009,10:565-566

(收稿日期:2013-05-14)

(修回日期:2013-05-31)

酶联免疫斑点技术对儿童结核病诊断的应用价值

孟珊珊 张乐乐 张海邻 胡晓光 张维溪 苏苗赏 罗运春

摘要 **目的** 研究 ELISPOT 试验在儿童结核病临床诊断中的应用价值。**方法** 对 2011 年 11 月~2012 年 11 月入住笔者医院的 32 例儿童结核病患者及 38 例非结核患儿进行痰涂片分析、结核抗体检测、PPD 试验及 ELISPOT 试验检测,比较分析不同方法的检测结果并进行统计学分析。**结果** ELISPOT 诊断儿童结核病的敏感度为 87.5%,特异性为 94.7%,与 PPD 试验相比,敏感度和特异性均高于 PPD 试验,但敏感度差异无统计学意义($P = 0.323$),特异性差异有统计学意义($P = 0.003$)。而与 PPD 强阳性诊断结核病的敏感度和特异性比较,特异性相仿($P = 0.485$),敏感度显著高于 PPD 试验($P < 0.001$)。ELISPOT 试验阳性率为 87.5%,显著高于痰培养及结核抗体检测阳性率,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** ELISPOT 试验具有相对较高的敏感度和特异性,是诊断儿童结核的快速敏感方法,在儿童结核感染早期临床诊断中有重要的应用价值。

关键词 结核 诊断 酶联免疫斑点技术 儿童

Clinical Application of Enzyme-linked Immunospot Assay in Dignosis of Pediatric Tuberculosis. Meng Shanshan, Zhang Lele, Zhang

作者单位:325027 温州医学院附属育英儿童医院呼吸科

通讯作者:张海邻,电子信箱:zhhlwz97@hotmail.com

Hailin, Hu Xiaoguang, Zhang Weixi, Su Miaoshang, Luo Yunchun. Department of Respiratory Diseases, Affiliated Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To explore the clinical application of enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT) in diagnosis of pediatric tuberculosis. **Methods** The 32 children with tuberculosis and 38 with other respiratory diseases were enrolled and performed ELISPOT. The ELISPOT results were compared with the results of PPD test and sputum culture as well as tuberculosis antibody test. **Results** The sensitivity and specificity of ELISPOT were 87.5% and 94.7%, respectively. The sensitivity of ELISPOT was higher than that of PPD test, although there was no statistically significant. The specificity of ELISPOT was significantly higher than of PPD test ($P = 0.003$). Then compared with the strong positive results of PPD test, the specificity of ELISPOT was similar to the strong positive results of PPD test and the sensitivity of ELISPOT was significantly higher than that of PPD test ($P < 0.001$). The positive rate of ELISPOT was significantly higher than those of sputum culture and tuberculosis antibody test in children with tuberculosis ($P < 0.01$). **Conclusion** ELISPOT had relatively high sensitivity and specificity. It is a sensitive and fast test to diagnose pediatric tuberculosis and can be applied in early diagnosis of tuberculosis in children.

Key words Tuberculosis; Diagnosis; ELISPOT; Children

结核病是由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 引起的全球关注的传染病之一, 是严重的公共卫生问题。儿童结核病的发病也有回升的趋势, 且儿童重症结核和肺外结核在增多, 主要原因是儿童结核病临床症状不典型、表现多样, 未能早期发现和及时诊断^[1,2]。目前, 儿童结核病的诊断主要是依靠患者的症状、结核病接触史、影像学检查、痰涂片和痰结核菌培养及 PPD 皮肤试验等, 但均有其局限性^[3]。酶联免疫斑点技术 (enzyme-linked immunospot assay, ELISPOT) 是通过检测经抗原刺激后分泌细胞因子 IFN- γ 的效应 T 淋巴细胞数量评价细胞免疫功能的方法, 具有快速、灵敏、不受卡介苗接种影响等特点, 已成为结核病早期诊断的研究热点, 并逐渐应用于临床^[4,5]。笔者于 2011 年 11 月~2012 年 11 月对入住笔者医院的 32 例儿童结核病患儿应用结核分枝杆菌复合群基因差异区 1 (region of difference, RD1) 编码的 2 种蛋白, 即早期分泌抗原靶 6kDa (early secretory antigenic target, ESAT-6)、培养滤液蛋白 10kDa (culture filtrate protein, CFP-10), 刺激患儿外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs), 检测分泌 IFN- γ 的效应细胞数量, 并用 38 例非结核感染患儿作为对照, 探讨该方法对儿童结核病的临床诊断价值, 现报告如下。

对象与方法

1. 研究对象: (1) 儿童结核组 (病例组) 共 32 例, 患者年龄 7 个月~15 岁, 平均年龄 6.28 ± 3.89 岁, 男性 16 例, 女性 16 例, 最终诊断为播散性卡介苗病 1 例, 结核性胸膜炎 8 例, 肺结核 8 例, 肺结核合并结核性胸膜炎 3 例, 肺结核合并结核性脑膜炎 2 例, 肺结核合并肠结核 3 例, 结核性脑膜炎 3 例, 结核性腹膜炎 1 例, 淋巴结核 2 例、支气管结核 1 例。

结核病诊断标准参考中华医学会儿科学分会呼吸学组和《中华儿科杂志》编辑委员会制定的儿童肺结核 (pulmonary tuberculosis, PTB) 的临床诊断标准制定^[5]: ①临床表现: 有发热、消瘦、乏力等结核中毒症状持续 2 周以上, 并有相应器官受累的临床表现; ②X 线检查: 有胸部、腹腔等脏器结核的征象; ③活动性结核病接触史; ④结核菌素试验阳性; ⑤痰液、胸腔积液、肺泡灌洗液或脑脊液杆菌涂片或培养阳性; ⑥抗结核治疗有效; ⑦除外其他相应疾病, 如各种感染、肿瘤、先天畸形、异物、间质性肺疾病等; ⑧组织病理检查符合结核特征。具有第①和第②项, 以及第③、④、⑥、⑦中的任何 2 项, 属于临床诊断病例。具有第①和第②项, 以及第⑤或⑧项者, 属于确诊病例。(2) 对照组 38 例, 年龄 2 个月~14 岁, 平均年龄 8.18 ± 4.22 岁, 男性 17 例, 女性 21 例, 入选标准为: ①无 MTB 相关感染依据 (痰或其他标本); ②缺少活动性结核临床症状; ③患儿未经抗结核治疗好转恢复。

2. 方法: (1) 采集患儿病史, 行 X 线、CT、PPD、痰涂片找结核杆菌以及结核抗体 (ELISA 法) 等检测。(2) 采集静脉血 5ml, 分离 PBMCs, 利用温州迪安医学检验中心提供的 ELISPOT-TB 试剂盒进行结核菌致敏 T 细胞检测。基本操作步骤如下: ①制备 PBMCs: 取枸橼酸钠抗凝的外周血 2~5ml, 用预热的 RPMI 1640 培养液 1:1 稀释, 将稀释血样以 2:1 的比例轻轻加入淋巴细胞分离液中, 室温下以 $1000 \times g$ 离心 22min, 将 PBMC 层移到新的离心管中; ②洗涤细胞: 加入 10ml RPMI 1640 混匀后, 再次离心 $600 \times g$ 7min 18°C 。小心弃掉上清液, 再次洗涤细胞, $350 \times g$ 7min 18°C 离心, 弃掉上清液, 在 0.7ml AIM-V 中轻柔重悬细胞; ③细胞计数: 取 $10\mu\text{l}$ 细胞悬液加入 $40\mu\text{l}$ 0.4% 台盼蓝中, 用移液管吸取 $10\mu\text{l}$ 混合液加入细胞计数板进行细胞计数, 调整细胞浓度至 $2.5 \times 10^5/100\mu\text{l}$; ④加样孵育洗版: 分别加 $50\mu\text{l}$ AIM-V、ESAT-6 (抗原 A)、CFP-10 (抗原 B) 和阳性对照于阴性对照孔、A 抗原孔、B 抗原孔和阳性对照孔, 每孔加入 $100\mu\text{l}$ 细胞稀释液, 将微孔板置于 37°C 5% CO_2 温箱培养 20h。弃去液体用 $200\mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS}$ 清洗 4 遍, 加 $50\mu\text{l}$ 酶标抗体工作液 (用 $1 \times \text{PBS}$ 1:200 稀释), 4°C 孵育

1h。用 PBS 清洗 4 遍,每孔加入 50 μ l 底物工作液,孵育 7min,可见显色斑点;⑤结果分析:用酶联斑点分析仪计数斑点数。检测结果判断:根据抗原 A 和(或)抗原 B 孔的反应判断结果:无反应性对照孔点数为 <5;有反应性样本应为:(抗原 A 或抗原 B 斑点数)减去(无反应性对照孔斑点数) ≥ 6 ;当无反应性对照孔斑点数 ≥ 6 ,有反应性样本应为:(抗原 A 或抗原 B 斑点数) ≥ 2 倍(无反应对照孔斑点数)。

3. 统计学方法:用 SPSS 17.0 统计软件,采用卡方检验对阳性率进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ELISPOT 检查结果:两组阳性共 30 例,其中 ESAT-6(抗原 A)阳性 25 例,CFP-10(抗原 B)阳性 30 例。病例组 32 例患儿中 ELISPOT 阳性 28 例,对照组 38 例患儿中 ELISPOT 阳性 2 例。ELISPOT 诊断儿童结核病的敏感度为 87.5%,特异性为 94.7%,假阴性率为 12.5%,假阳性率为 5.3%。病例组 32 例患儿中,24 例对 ESAT-6 抗原显著应答,阳性率为 75.0%,28 例对 CFP-10 抗原显著应答,阳性率为 87.5%,提示经 ESAT-6 抗原诱导刺激的 ELISPOT 检测阳性率低于 CFP-10 抗原,但差异无统计学意义($P = 0.125$)。

2. ELISPOT 试验和 PPD 试验结果比较:两组患儿 PPD 试验阳性共 34 例,其中“+”3 例,“++”24 例,“+++”6 例,“++++”1 例(表 1)。病例组 32 例患儿中有 29 例行 PPD 试验,22 例阳性,对照组 38 例患儿 37 例行 PPD 试验,阳性 12 例。PPD 试验诊断结核病敏感度为 75.9%,特异性为 67.6%,假阴性率为 24.1%,假阳性率为 32.4%。与 ELISPOT 相比,敏感度和特异性均低于 ELISPOT 检测,但敏感度差异无统计学意义($\chi^2 = 1.394, P = 0.323$),特异性差异有统计学意义($\chi^2 = 9.115, P = 0.003$)。而若以 PPD 强阳性(包括 PPD 试验“+++”和“++++”)作为结核病诊断的依据,则 PPD 强阳性诊断结核病的敏感度是 24.1%,特异性 100%,假阳性率为 0,假阴性率为 75.9%,和 ELISPOT 试验比较,特异性相仿($\chi^2 = 0.487, P = 0.485$),敏感度显著低于 ELISPOT 试验($\chi^2 = 24.974, P = 0.000$)。

3. ELISPOT 试验与其他检测方法结果的比较:32 例病例组患儿 ELISPOT 试验阳性率为 87.5%;痰培养找抗酸杆菌检测 20 例,2 例阳性,阳性率为 10%;结核抗体检测 24 例,3 例阳性,阳性率为 12.5%;这两种检测方法阳性率均较 ELISPOT 阳性率低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)(表 2)。

表 1 PPD 试验结果和 ELISPOT 试验结果比较

组别	ELISPOT	PPD 试验结果					
		-	+	++	+++	++++	+++++
病例组	ELISPOT(-)(n=4)	1	0	1	2	0	
(n=29)	ELISPOT(+)(n=25)	6	0	14	4	1	
对照组	ELISPOT(-)(n=35)	25	3	7	0	0	
(n=37)	ELISPOT(+)(n=2)	0	0	2	0	0	

表 2 结核感染组 ELISPOT 与痰培养、结核抗体检测结果的比较

项目	阳性例数/受试例数	阳性率(%)	χ^2	P
ELISPOT 试验	28/32	87.5		
痰培养	2/20	10.0	30.286	0.000
结核抗体检测	3/24	12.5	18.056	0.000

讨 论

结核病是导致发展中国家儿童发病和死亡的重要原因。我国是是全球 27 个耐多药结核病流行严重的国家之一,2011 年全球有 870 万新发结核病患者,其中我国有 100 万,占全球发病的 11.5%,位居全球第 2 位^[6]。儿童结核病的流行状况间接地反映国家和地区结核病的控制状况,且儿童结核常为成人继发性结核病的根源,因此早期诊断、及时治疗儿童结核病是结核病控制的关键^[7]。

结核菌检查是结核病的直接病原学证据,特异性高,是结核病早期诊断的重要依据。目前,结核菌检查方法主要是通过痰或脑脊液、胸腔积液等标本涂片查抗酸杆菌,还有结核菌培养法、PCR 技术、动物实验等^[8]。小儿结核病患者由于结核菌的载量很低,再加上婴幼儿不会排痰,因此直接涂片查抗酸杆菌的阳性率很低,本组 20 例痰涂片仅 2 例阳性,阳性率仅 10%。培养法周期较长、要求比较高,应在具备条件的实验室进行。

PCR 同样需要一定的设备,而且对技术要求高,并不适合综合性医院开展,而动物实验在临床和防治工作中已基本不用^[8]。以结核抗体检测为代表的免疫学诊断方法在临床被广泛应用,但由于结核分支杆菌作为一种胞内寄生菌,机体的抗结核免疫主要依赖于特异性的细胞免疫,因此 ELISA 法检测结核抗体的特异性和敏感度均会受到明显影响,本组 24 例结核抗体也仅阳性率 12.5%(3/24)。因此,临床亟需一种儿童结核病早期诊断的检查手段。

本研究观察 32 例儿童结核病患者和 38 例对照组的 ELISPOT 试验结果,发现 ELISPOT 的敏感度为 87.5%,特异性为 94.7%,假阴性率为 12.5%,假阳

性率为 5.3%,提示该试验对儿童结核病早期诊断有较好的应用价值。基于 T 细胞的 IFN- γ 释放试验(interferon- γ release assay, IGRA)是结核诊断领域的新进展。其原理是被 MTB 特异性抗原刺激而致敏的记忆 T 淋巴细胞,遇到同类抗原时能产生 IFN- γ ,对于分离的全血或外周血单个核细胞在 MTB 特异性抗原刺激后产生的 IFN- γ 进行检测,就可判断是否存在结核感染。

本组患儿 ELISPOT 试验检测采用的 MTB 特异性抗原为 ESAT-6 和 CFP-10,其编码基因 RD1 (region of deletion 1)是卡介苗和绝大多数非结核分枝杆菌所缺失的基因,因此避免了传统结核菌素皮试中所存在的卡介苗交叉抗原反应,能够较好地地区分真性结核感染或卡介苗接种诱导的假阳性反应,表现出优异的敏感度和特异性^[9]。研究中病例组有 4 例患儿在 ELISPOT 试验中出现假阴性结果,原因之一可能是先前的抗结核治疗降低了患儿体内的活结核菌数,导致试验中斑点形成细胞数减少造成假阴性;其次,有少数结核患儿的淋巴细胞数值偏低,可能对 ESAT-6 或 CFP-10 抗原不能产生足够的 T 细胞免疫反应,也会导致假阴性结果^[4]。同时本研究应用 ELISPOT 试验对两种抗原检测结果进行联合判断,发现结核感染患儿中经 ESAT-6 抗原诱导刺激的 ELISPOT 检测阳性率低于 CFP-10 抗原,但差异无统计学意义($P=0.125$)。有报道使用两种多肽抗原的敏感度要高于任何单一抗原的敏感度,因此目前常采用两种抗原的联合检测^[10]。

结核菌素皮肤试验(TST)是目前广泛用于诊断儿童活动性及潜伏性结核感染的首选方法,本研究发现,虽然 ELISPOT 试验的敏感度略高于 PPD 试验(87.5% vs 75.9%),但差异没有统计学意义,和文献报道相似^[9]。而 ELISPOT 试验的特异性明显优于 PPD(94.7% vs 67.6%),差异有统计学意义($\chi^2=9.115, P=0.003$),主要原因是 PPD 为多种蛋白成分的混合物,PPD 阳性很难鉴别非结核分枝杆菌感染和卡介苗接种后反应。尤其是我国卡介苗的接种率达到 98%,由卡介苗接种引起的 PPD 假阳性较多,诊断特异性降低。

一项在成人中的研究同样证实 ELISPOT 试验的

特异性高于 PPD 试验^[10]。因为 PPD 强阳性对结核病的诊断依据远大于弱阳性或中等阳性^[8]。笔者统计了 PPD 强阳性对结核病的诊断价值,虽然特异性升高,但和 ELISPOT 试验相仿(100% vs 94.7%, $\chi^2=0.487, P=0.485$),敏感度则降至 24.1%,显著低于 ELISPOT 试验($\chi^2=24.974, P=0.000$)。因此,ELISPOT 试验的诊断价值大于 PPD 试验,尤其在临床高度怀疑结核而 PPD 试验阴性或弱阳性时能够为临床提供早期快速的辅助诊断依据。

综上所述,ELISPOT 试验在用于儿童结核病的诊断中具有较高的临床价值。当临床高度怀疑结核患儿出现阴性 PPD 试验结果或为排除接种卡介苗引起的假阳性结果时可选择该试验。

参考文献

- 江载芳. 加强和完善儿童肺结核的诊治[J]. 中华儿科杂志, 2006,44(4):241-242
- 余刚, 张海邻, 林忠东, 等. 综合性医院儿童肺外结核 298 例临床分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011,34(5):388-389
- Andrea TC, Anna MM. New advances in the diagnosis and treatment of pediatric tuberculosis[J]. Clin Invest, 2013, 3(1):69-82
- Meier T, Eulenbruch HP, 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
- 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑部, 等. 儿童肺结核的临床诊断标准和治疗方案(试行)[J]. 中华儿科杂志, 2006,44(4):249-251
- World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012[EB/OL]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
- 成诗明, 杜昕, 徐敏. 1992~2004 年全国儿童新发现的痰涂片阳性肺结核监测与分析[J]. 中华儿科杂志, 2006,44(4):257-261
- 江载芳, 易著文. 实用小儿结核病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:75-143
- Diel R, Lodenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon- γ release assays for detecting active TB: a Meta analysis[J]. Chest, 2010,137(4):952-968
- Hill PC, Jackson S, Sillah D, Fox A, et al. ESAT-6/CFP-10 fusion protein and peptides for optimal diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection by ex vivo enzyme-linked immunospot assay in the Gambia[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(5):2070-2074

(收稿日期:2013-04-08)

(修回日期:2013-05-20)