

脑脊液 T-SPOT 检测在结核性脑膜炎 诊断中的临床应用价值*

宋月娟,冯强生,哈小琴

(中国人民解放军兰州军区兰州总医院检验科,兰州 730050)

摘要:目的 探讨脑脊液结核斑点试验(T-SPOT)检测在结核性脑膜炎临床诊断中的价值,为结核性脑膜炎早期快速诊断提供实验依据。方法 对兰州军区兰州总医院 221 例脑脊液标本进行筛查,实验组选取脑脊液淋巴细胞计数大于 $100 \times 10^6/L$ 或者高度怀疑脑膜炎患者淋巴细胞计数大于 $50 \times 10^6/L$ 的 82 例脑脊液标本进行 T-SPOT 实验检测,统计分析患者临床诊断、脑脊液检测指标、血清 PCT 结果,对照组选取 100 例非结核性脑膜炎患者进行 ROC 曲线分析。结果 脑脊液结核斑点试验检测在结核性脑膜炎患者中的阳性率为 64.63%(53/82),敏感度为 98.11%,特异度为 100%;结核性脑膜炎患者脑脊液淋巴细胞计数、脑脊液蛋白、脑脊液葡萄糖、脑脊液氯离子值和血清 PCT 的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.996,0.965,0.109,0.061 和 0.392,且结核性脑膜炎患者脑脊液淋巴细胞计数和脑脊液蛋白的均值分别为 323.88 ± 198.76 个/L, 1478.2 ± 778.64 mg/L。结论 脑脊液结核斑点试验检测在结核性脑膜炎患者中具有较高的阳性率、敏感度和特异度,可用于结核性脑膜炎的早期快速诊断。

关键词:脑脊液;结核斑点试验;结核性脑膜炎;诊断

中图分类号:R529.3;R446.14 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2018)05-115-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2018.05.031

Clinical Application Value of CSF T-SPOT. TB Detection in Diagnosis of Tuberculous Meningitis

SONG Yue-juan, FENG Qiang-sheng, HA Xiao-qin (Department of Clinical Laboratory,
Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region of the PLA, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To investigate the value of CSF T-SPOT. TB detection for the rapid early diagnosis of tuberculous meningitis. **Methods** 80 cases of TBM intracranial infection in Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Region were selected if the count of CSF lymphocytes was larger than $100 \times 10^6/L$ or highly suspected patients with tuberculous meningitis lymphocyte counts were larger than $50 \times 10^6/L$ as the observation group, and 100 cases control group patients' clinical diagnosis, CSF of lymphocytes numbers, protein, glucose, chloride ion and PCT of the blood for the ROC curve analysis. **Results**

This detection of CSF by T-SPOT in tuberculous meningitis established a high positive rate was 64.63% (53/82), the sensitivity was 98.11% and the specificity was 100%. The CSF of lymphocytes number, protein, glucose, chloride ion and PCT of the blood under the ROC curve area were 0.996, 0.965, 0.109, 0.061 and 0.392 respectively in patients with tuberculous meningitis, and the average values of cerebrospinal fluid lymphocyte count and cerebrospinal fluid protein were 323.88 ± 198.76 A/L, 1478.2 ± 778.64 mg/L respectively. **Conclusion** Cerebrospinal fluid specimens detected by T-SPOT showed a high positive rate sensitivity and specificity in tuberculous meningitis, it may use early rapid diagnosis of tuberculous meningitis successfully.

Keywords: cerebrospinal fluid; T-SPOT detection; tuberculous meningitis; diagnosis

结核性脑膜炎(tuberculous meningitis, TBM)的早期表现不典型,治疗周期长,尽管积极抗结核治疗,但病死率仍高达 19.0%~28.9%^[1],早期准确的诊断是治疗的关键。目前尚缺乏理想的早期诊断结核性脑膜炎的实验方法,脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)涂片抗酸染色敏感度往往<20%,脑脊液培养敏感度为 25%~70%,在发展中国家仅为 10%,且需要等待数周才能得到结果^[2]。而采用 PCR 法检测脑脊液中结核分枝杆菌 DNA,

由于其假阳性较多,实验条件要求较高,故难以在结核性脑膜炎多发的欠发达地区普及和推广。结核斑点试验(T-SPOT)广泛用于结核病的诊断,但 T-SPOT 脑脊液检测在结核性脑膜炎中的诊断价值鲜见文献报道。本文回顾性分析我院 82 例结核性脑膜炎脑脊液 T-SPOT 检测的患者资料,分析脑脊液标本结核斑点试验(T-SPOT)检测、CSF 生化和血清降钙素原(PCT)的变化,为结核性脑膜炎患者的早期诊断提供实验依据。

* 作者简介:宋月娟(1986—),女,硕士,主管检验技师,从事微生物免疫工作,E-mail:fqs328@163.com。

1 材料与方法

1.1 研究对象 对本院 221 份脑脊液标本进行筛查,统计脑脊液淋巴细胞计数大于 $100 \times 10^6/L$ 或者高度怀疑脑膜炎患者淋巴细胞计数大于 $50 \times 10^6/L$ 的 82 例脑脊液标本进行结核斑点试验检测的实验结果,查阅临床病例资料,根据患者临床诊断,统计结核性脑膜炎实验组和对照组患者脑脊液蛋白、脑脊液葡萄糖、脑脊液氯离子、脑脊液淋巴细胞计数和患者血清 PCT 等指标进行 ROC 曲线分析。

1.2 仪器与试剂 T-SPOT TB 试剂盒购自英国 Oxford 公司。离心机购自湖南湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 检测方法

1.3.1 脑脊液结核斑点试验操作步骤:取脑脊液 4 ml 以上,放入 15 ml 离心管中(加 AIM-V 至 3 ml),700 g 离心 7 min;倒掉上清,混匀细胞沉淀后再加入 AIM-V 培养液至 3 ml,700 g 离心 7 min;倒掉上清,加入 500 μ l AIM-V 培养液,震荡混匀;取 80 μ l 细胞悬液至细胞计数仪或显微镜计数细胞,按顺序加入阴性对照(AIM-V)、抗原 A,抗原 B,阳性对照,各 50 μ l,每孔加 100 μ l 配置好的细胞液(2.5×10^5 /孔);标注时间,放入 CO_2 培养箱培养 16~20 h,次日准备 PBS 液,根据标本量计算酶标二抗所需的量,以 1:200 的比例将酶标二抗原液与 PBS 液混合(混合一定要充分均匀),制成二抗工作液;将过夜培养的 96 孔板中培养液倒掉,每孔加入 200 μ l PBS 液洗板 4 遍后拍干板孔,每孔加 50 μ l 二抗工作液 4~8℃ 孵育 1 h;将酶标二抗液体倒掉,每孔用 PBS 液洗涤 4 遍,拍干后加显色液各 50 μ l,避光静置 5~10 min(阳性孔出现密布的斑点),用蒸馏水洗涤终止反应;将板孔内液体拍干,晾至底膜干透可以 4×物镜显微镜检斑点或上机读取并记录报告结果。

1.3.2 检测原理:脑脊液分离单个核细胞;结核特异性抗原(ESAT-6/CFP10)与脑脊液单个核细胞孵育,结核致敏的效应 T 淋巴细胞分泌 γ -干扰素“双抗夹心法”检测释放的 γ -干扰素,从而检测结核致敏的效应 T 淋巴细胞是否存在,从而判断患者是否存在结核分枝杆菌感染(包括潜伏性结核分枝杆菌感染与活动性结核分枝杆菌感染)。

1.4 统计学分析 软件应用 spass17.0,非计量数据用卡方检验,多组数据比较采用 ROC 曲线。

2 结果

2.1 82 例脑脊液标本结核斑点试验检测结果 脑脊液 T-SPOT 试验检测在结核性脑膜炎患者中的阳性率为 64.63%(53/82),敏感度为 98.11%,

特异度为 100%,其中结核性脑膜炎患者年龄中位数为 30.08 岁,男/女为 2.71。非结核性脑膜炎 29 例患者中,病毒性脑膜炎 8 例,细菌性脑膜炎 5 例,疑似结核性脑膜炎 3 例,炎性脱髓鞘性疾病 1 例,非脑炎 11 例,假阳性 1 例。

2.2 结核性脑膜炎患者和非结核性脑膜炎患者脑脊液生化和血清感染指标 ROC 曲线分析 ROC 曲线下面积(AUC)大小分别为脑脊液淋巴细胞计数 0.996,脑脊液蛋白 0.965,PCT 0.392,脑脊液葡萄糖 0.109 和脑脊液氯离子 0.061,所以脑脊液淋巴细胞计数和脑脊液蛋白具有较高的敏感度和特异度,且结核性脑膜炎患者脑脊液淋巴细胞计数和脑脊液蛋白的均值分别为 323.88 ± 198.76 个/L, 1478.2 ± 778.64 mg/L。

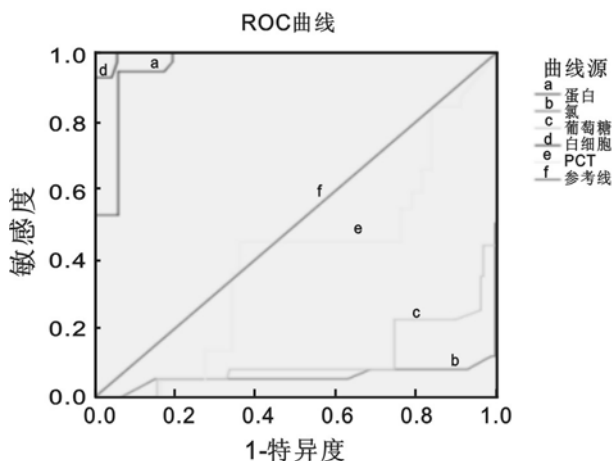


图1 结核性脑膜炎患者和非结核性脑膜炎患者脑脊液生化和血清 PCT ROC 曲线分析

3 讨论 结核斑点实验(T-SPOT)作为一种新的酶联免疫斑点技术,为结核病的早期诊断提供了新的方法。它是利用结核分枝杆菌感染患者淋巴细胞中存在结核特异的活化 T 淋巴细胞,这些淋巴细胞在受到结核分枝杆菌特异抗原 ESAT-6 或 CFP-10 刺激,分泌 γ 干扰素, γ 干扰素是结核分枝杆菌感染后机体免疫应答中最重要的细胞因子,具有抗感染、抗肿瘤活性和免疫调节作用,在机体抗感染与免疫中发挥重要作用^[3,4]。据国外文献报道,结核斑点试验诊断结核性脑膜炎的敏感度为 83%~97%,特异度高达 100%^[5]。回顾性分析我院 82 例疑似结核性脑膜炎患者脑脊液 T-SPOT 检测结果、脑脊液生化指标和血清感染指标 PCT 的变化,表明 T-SPOT 检测在结核性脑膜炎患者具有较高的阳性率为 64.63%(53/82),敏感度为 98.11%,特异度为 100%,敏感度和特异度均高于陈永芳等^[6]研究的外周血 T-SPOT. TB 检测结核性脑膜炎敏感度 67.5%和张秀英等^[7]

(下转 120 页)

T-SPOT. TB 法检测脑脊液单个核细胞对结核性脑膜炎检测敏感度 93.33%, 特异度 96.67%。结核性脑膜炎患者和非结核性脑膜炎患者脑脊液生化和血清感染指标 PCT ROC 曲线分析曲线下面积(AUC)大小分别为脑脊液白细胞数 0.996, 脑脊液蛋白 0.965, PCT 0.392, 脑脊液葡萄糖 0.109 和脑脊液氯离子 0.061, 表明脑脊液淋巴细胞计数和脑脊液蛋白测定价值优于血清 PCT, 脑脊液葡萄糖和脑脊液氯离子的测定。数据显示结核性脑膜炎患者脑脊液淋巴细胞计数和脑脊液蛋白的均值分别为 323.88 ± 198.76 个/L, 1478.2 ± 778.64 mg/L。但脑脊液蛋白含量受年龄的影响以及淋巴细胞计数受创伤和蛛网膜下腔出血等因素影响^[8], 应注意排除其他因素的干扰。

本实验检测方法检验时间短, 24 h 内可以回报临床实验结果, 而且标本阴阳性结果观测直观, 易于保存, 并且阳性率、敏感度和特异度高, 对实验条件要求较低, 与临床同类实验 XpertMTB/RIF 对结核性脑膜炎的临床诊断价值比较有待进一步的验证^[9]。本实验缺点为患者脑脊液标本要求大于 5 ml, 需进行脑脊液淋巴细胞数计数筛查合格标本, 而且标本放置时间不宜过长, 需要及时处理。

总之, 脑脊液 T-SPOT. TB 检测是诊断结核性脑膜炎的一种较为快速、经济、敏感度和特异度高的一种方法, 可用于结核性脑膜炎的早期快速诊断。

参考文献:

- [1] Titone L, Di Carlo P, Romano A, et al. Tuberculosis of the central nervous system in children; 32 years survey[J]. *Minerva Pediatr*, 2004, 56(6): 611-617.
- [2] Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S, et al. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12(6): 651-657.
- [3] Beverley PC. Primer; making sense of T-cell memory [J]. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008, 4(1): 43-49.
- [4] 陆迪雅, 陈 澍, 高有方, 等. 外周血结核感染 T 淋巴细胞斑点试验和脑脊液 γ 干扰素检测诊断结核性脑膜炎的价值[J]. *中华传染病杂志*, 2014, 32(6): 338-342.
- Lu DY, Chen S, Gao YF, et al. Performance of peripheral blood T-SPOT. TB and cerebrospinal fluid interferon- γ in the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *Chin J Infect Dis*, 2014, 32(6): 338-342.
- [5] Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century; new tools to tackle an old enemy E[J]. *Chest*, 2007, 131(6): 1898-1906.
- [6] 陈永芳, 任鹏飞, 陈 裕, 等. 探讨外周血 T-SPOT. TB 检测对结核性脑膜炎的诊断价值[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2014, 17(17): 87-88.
- Chen YF, Ren PF, Chen Y, et al. To explore the diagnostic value of peripheral blood T-SPOT. TB in tuberculous meningitis[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2014, 17(17): 87-88.
- [7] 张秀英, 吴若芬, 范学文. T-SPOT. TB 法检测脑脊液单个核细胞对结核性脑膜炎早期诊断价值的研究[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2013, 13(2): 110-115.
- Zhang XY, Wu RF, Fan XW. Study on the early diagnostic value of T-SPOT. TB assay detecting mononuclear cells in cerebrospinal fluid of patients with tuberculous meningitis [J]. *Chin J Contemp Neurol Neurosurg*, 2013, 13(2): 110-115.
- [8] 武俊平, 吴 琦. 结核性脑膜炎诊断与治疗研究进展[J]. *国外医学(呼吸系统分册)*, 2005, 25(1): 49-51.
- Wu JP, Wu Q. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculous meningitis[J]. *Section on Respiratory System Foreign Medical Sciences*, 2005, 25(1): 49-51.
- [9] 张瑞雪, 龙 钢, 冯国栋, 等. Xpert MTB/RIF 对结核性脑膜炎诊断的临床评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(6): 442-447.
- Zhang RX, Long Y, Feng GD, et al. The evaluation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *Chin J Lab Med*, 2016, 39(6): 442-447.

收稿日期: 2018-03-13

修回日期: 2018-07-18