

痰涂阳性肺结核患者密切接触者结核菌感染情况调查

幸彩梅¹, 朱秀云², 赵丹³, 张兴树³, 张洁云², 顾美红², 张明霞², 钱起丰²

摘要:目的 应用早期建立的结核分枝杆菌特异性IFN- γ 酶联免疫斑点(Elispot)检测技术,以及结核菌素皮肤试验评价痰涂阳性肺结核患者密切接触者中结核菌的感染情况。方法 采用Elispot技术检测1 242例痰涂阳性肺结核患者的密切接触者进行外周血结核菌特异性IFN- γ 水平,同时平行进行PPD皮试。结果 Elispot在密切接触者以及接触者中家属,朋友的阳性率分别是30%,34.25%和22.1%,PPD相应的结果是13.2%,15.57%和8.9%;两者阳性率比较差异有统计学意义($P<0.01$)。Elispot阳性率在不同年龄组均高于PPD,结果差异均有统计学意义。在47例确诊肺结核患者(发病率达3.78%)中,其中Elispot阳性34例(72.34%),PPD强阳性12例(25.53%);两者阳性率有统计学意义($P<0.01$)。结论 与PPD比较利用Elispot诊断结核潜伏感染有较高辅助诊断价值。利用Elispot监测结核密切接触者,有利于早期发现结核病人。

关键词: γ 干扰素;酶联免疫斑点;结核菌素皮肤试验;结核菌感染

中图分类号:R521 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2013)6-684-03

Investigation of contacts of persons with smear-positive pulmonary tuberculosis patients. XING Cai-mei¹, ZHU Xiu-yun², ZHAO Dan², et al. (1. Laboratory Department of Futian Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong, P. R. China)

Abstract:Objective To survey the infectious status of *Mycobacterium tuberculosis* in close contacts with smear-positive tuberculosis patients through the early establishment of mycobacterium tuberculosis specificity IFN- γ enzyme-linked immune spot (Elispot) detection technology and tuberculin skin test (TST). **Methods** The IFN- γ levels of 1 242 samples of close contacts with smear-positive tuberculosis patients were detected by using Elispot and PPD skin tests in parallel at the same time. **Results** The positive rates of Elispot in close contacts as well as their family members and friends were 30%, 34.25% and 22.1%, respectively, where the corresponding results of PPD were 13.2%, 15.57% and 8.9%; The positive rates of both were statistically significant. Elispot positive rates in different age groups were higher than PPD, and the results were statistically significant($P<0.01$). In 47 confirmed TB patients (with incidence of 3.78%), there were 34 cases of positive Elispot (72.34%) and 12 cases of PPD strong positive (25.53%); The positive rates of both were statistically significant($P<0.01$). **Conclusions** Compared with PPD, Elispot is of higher value in diagnosis of latent tuberculosis infection and thus it is suitable for early detection of tuberculosis cases.

Key words: Interferon- γ ; Elispot; PPD; Tuberculous infection

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染病,目前随着耐药结核的出现、艾滋病合并感染和流动人口增加,结核病的疫情变得十分严重,严重危害公众的健康和生命安全。由于结核病是经呼吸道传染,在人口密集和空气流通不畅的地方容易传播,尤其是与活动性肺结核患者近距离的接触者,其感染和发病的风险明显高于一般人群。人体发生结核菌暴露后,只有30%的人群发生结核菌感染。传统的用于检测结核病感染的方法是结核菌素试验,但该方法的特异性差,不能有效区分结核菌感染和BCG接种^[1]。

近年来,发展起来的结核特异性IFN- γ 释放试验(Interferon gamma release assays,IGRAs)以其高敏感性和特异性、操作简单方便、时间短等优点,越来越受

到重视^[2]。为此,我们研发了具有自主知识产权用于结核感染诊断的IFN- γ 酶联免疫斑点(Enzyme linked immunospot assay,Elispot)试剂盒^[3],该技术不仅广泛应用于结核病的诊断和鉴别诊断^[4],而且在了解活动性结核患者密切接触者的感染和发病情况方面显示出其特有的优势,本文对深圳市罗湖区慢性病防治院和深圳市第三人民医院2009~2011年选取397例痰涂阳性肺结核患者的密切接触者共1242例进行了随访调查,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选取2009年1月~2010年12月期间在深圳市罗湖区慢性病防治院和深圳市第三人民医院就诊的痰涂阳性肺结核患者397例,随访与其密切

基金项目:国家自然科学基金项目(No.81172732)(No.81171535)

作者单位:1.深圳市福田中医院检验科,广东 深圳 518048; 2.深圳市第三人民医院,广东 深圳 518112; 3.深圳市罗湖区慢性病防治院,广东 深圳 518029

作者简介:幸彩梅(1973~),女,汉族,广东连平,学士,副主任检验技师,研究方向:免疫与微生物。

接触的家属、同事共1 242例,其中男575例,女667例。平均年龄(30.30±14.84)岁。

1.2 方法

1.2.1 Elispot检测外周血结核菌特异性IFN- γ 采集肝素锂抗凝的静脉血4mL,6h内利用Ficoll密度梯度离心法分离外周血单个核细胞(Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC),加入无血清培养基(U-Cy-Tech Bioscience, The Netherlands)重悬细胞,细胞计数仪计数,调整细胞密度为 2.0×10^6 个/mL。在预包被好抗体的板中加入细胞100 μ L/孔。阴性对照孔中不加入任何刺激物;阳性对照每孔加入5 μ L植物血凝素(PHA),终浓度5 μ g/mL。实验孔中分别加入经筛选确定的结核菌重组蛋白抗原(ESAT-6)、结核菌多肽抗原组合PB+P8.10,终浓度均为5 μ g/孔。然后盖上市盖,放入37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养16~24h。第二天洗板后,加入检测抗体孵育1h,洗板后再加入亲和素孵育1小时。最后加入DAB显色剂显色。显色洗板后,待板自然晾干后在Elispot读数系统自动读数,并记录斑点数量^[3]。

1.2.2 结核菌素皮试(PPD皮试) 结核菌素皮试由有经验的护理人员操作。密切接触者在采血后进行PPD皮试:取0.1mL结素稀释液,四川生物制品公司生产的标准PPD(含5个结核菌素单位)^[6],左前臂掌侧中、下1/3交界处皮肤做皮内注射,使之形成6~10mm的皮丘。在注射后72h根据前臂注射部位皮肤硬结直径的记录结果,硬结直径大于20mm者为强阳性反应,除硬结外,皮肤上还有水疱,坏死或淋巴管炎者为极强阳性反应。

1.3 胸片检查 密切接触者均进行X线胸片检查。

1.4 结果判定 Elispot阳性标准:每个斑点代表结

核分枝杆菌特异抗原激活的一个分泌IFN- γ 的效应T淋巴细胞,在阳性对照有应答的情况下,实验孔的IFN- γ 的应答情况等于实验孔斑点数减去阴性对照孔的斑点数。通过记录斑点数就可得知结核分枝杆菌特异抗原激活的效应T淋巴细胞的数量。

按照上述Elispot实验方法,然后根据前期ROC曲线确定的阳性阈值为斑点形成细胞(SFCs)数的均值 ± 1 个标准差,对应2个刺激物的阳性判断阈值分别为40,30个斑点/孔。即ESAT-6蛋白抗原孔形成的SFCs ≥ 40 ,或多肽抗原孔SFC ≥ 30 判断为阳性。

2 结果

2.1 密切接触者结核菌潜伏感染率的情况 通过对1 242例肺结核密切接触者进行了Elispot检测,PPD,以及X线胸片检查。发现Elispot阳性372例(30%),PPD强阳性164例(13.2%),Elispot的阳性率明显高于PPD,二者差异有统计学意义($P < 0.01$);同时对1 242例接触者进行分类,发现家属的结核感染率明显高于同事的感染率,结果见表1。

2.2 密切接触者不同年龄结核菌潜伏感染的情况 对1 242例密切接触者根据不同年龄进行分组,发现在各个年龄段Elispot的阳性率高于PPD的阳性率,统计学差异明显,结果见表2。

2.3 1 242例密切接触者中潜伏感染后的发生结核病的情况 对1 242密切接触者进行6个月的随访,发现了47例经X线证实的肺结核患者,发病率达3.78%(47/1242)。其中Elispot阳性34例(72.34%),PPD阳性12例(25.53%);二者阳性率有统计学意义($P < 0.01$),与PPD相比,Elispot不仅在结核潜伏感染的诊断中有价值,而且在早期发现患者的意义更大。

2.4 1 242例密切接触者结核菌潜伏感染后的发病情

表1 1 242例密切接触者PPD及Elispot试验反应情况:

Table 1 Results of PPD and Elispot tests in 1 242 close contacts

	观察例数 Observation number	男 Male/女 female	平均年龄 Average age	PPD强阳性例数 No. PPD positives (%)	ELISPOT阳性例数 No. ELISPOT positives (%)	P值 P value
家属 Family members	803	379/424	32.08±16.79	125(15.57)	275(34.25)	$P < 0.0001$
同事 Colleagues	439	196/243	27.04±9.56	39(8.9)	97(22.1)	$P = 0.002$
合计 Total	1242	575/667	30.30±14.84	164(13.2)	372(30)	$P < 0.0001$

表2 1 242例密切接触者不同年龄组PPD及Elispot试验反应情况

Table 2 Results of PPD and Elispot tests in 1 242 close contacts of different age groups

年龄(岁) Age (Year)	观察例数 Observation number	男 Male/女 female	平均年龄 Average age	PPD强阳性例数 No. PPD positives (%)	ELISPOT阳性例数 No. ELISPOT positives (%)	P值 P value
0~5	64	35/29	3.00±1.31	2(3.1)	13(20.3)	$P = 0.0055$
6~15	127	61/66	11.59±3.11	11(8.7)	30(23.6)	$P = 0.004$
16~25	272	112/160	22.11±2.57	30(11.0)	77(28.3)	$P < 0.0001$
26~35	408	197/211	29.84±2.78	52(12.7)	121(29.7)	$P < 0.0001$
35	371	170/201	47.96±10.48	70(18.9)	132(35.6)	$P < 0.0001$

况 对1 242密切接触者进行6个月的随访,发现了47例经X线证实的肺结核患者,发病率达3.78%(47/1242)。其中Elispot阳性34例(72.34%),PPD阳性12例(25.53%);二者阳性率有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

肺结核是通过呼吸道传染的疾病,患者咳嗽、打喷嚏、大声说话时喷出带有大量结核杆菌的飞沫,在人口密集和空气不流通的地方会导致部分近距离密切接触者吸入结核杆菌而造成肺部感染,和病人密切接触的人群多数是其家属和一起工作的同事或室友,这些人和病人朝夕相处,暴露在结核菌的环境时间长,吸入结核菌的机会多,是结核感染的高危人群。为此,对这些人群进行调查随访,早期发现结核潜伏感染者,及时对其进行干预和预防性治疗,不仅可以控制结核病的发生,而且可以减少结核病的传播。

本研究通过对1 242例结核密切接触者进行随访发现,家属结核菌的感染率明显高于同事,PPD的阳性率分别是15.57%和8.9%,Elispot的阳性率分别是34.25%和22.1%,Elispot的检出率明显高于PPD的检出率,说明Elispot用于结核潜伏感染的筛查敏感性和特异性优于PPD。家属密切接触者结核菌的感染率高说明家属被结核菌感染的机率是相当高的,究其原因可能是家属密切接触者和同事相比,与菌阳患者相处的时间更长,接触的距离更近,导致感染^[6]。通过对密切接触者不同年龄组的分析,发现在各个年龄段Elispot的阳性率均高于PPD的阳性率,而且随着年龄的增加,感染率有逐渐增高的趋势,35岁年龄组感染率最高为35.6%,与谢美凤报道基本一致^[7]。

在对1242例结核密切接触者的随访中,发现47例经X胸片证实为活动性肺结核患者,发病率为3.78%,高于林定文的报道^[8],这可能与该地区人口密集程度高以及气候温暖等因素有关。这些密切接触者之所以发病,说明其在随访过程中可能我们医护人员的宣教和督导工作没落到实处,没有让感染者引起足够的重视,没有使其了解到结核病对自身和社会的危害以及必要的防范措施,这些人当时并未意识到自己可能或已经发病,使得病菌在一定时间内得以传播。随访过程中结核潜伏感染者的发病提示我们对活动性肺结核患者的密切接触者要定期进行结核菌

感染的随访和督导,及时了解感染者的身体状况,进行必要的检查,做到早发现、早预防、早治疗结核病,减少结核病在社区的传播。结核特异性Elispot诊断结核感染的特异性和敏感性均高于传统的PPD试验,同时在提高结核病的发现率方面也具有明显优势,建议有条件的地区用Elispot代替PPD用于结核感染人群的随访工作。

参考文献:

- [1] Drobniowski FA, Caws M, Gibson A, Young D. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2003, 3(3): 141-147.
- [2] Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle an old enemy[J]. *Chest*. 2007,131(6):1898-1906.
- [3] Xinchun Chen, Qianting Yang, Mingxia Zhang, et al. Diagnosis of Active Tuberculosis in China Using an In-House Gamma Interferon Enzyme-Linked Immunospot Assay[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2009,16(16): 879-884.
- [4] Chen XC, Liao MF, Zhu XY, et al. Tuberculosis bacterium specificity of IFN- γ Elispot test in the diagnosis of active tuberculosis and tuberculosis infection [J]. *J Tubercul Defense*, 2010, 32 (11) : 747-751 (In Chinese)
(陈心春,廖明凤,朱秀云,张洁云,陈涛,张明霞,顾美红,张帆,余卫业,周伯平.结核菌特异性IFN- γ Elispot检测在活动性结核病和结核感染诊断中的应用[J].中国防痨杂志,2010,32(11):747-751)
- [5] Tu DH. Tuberculin experiment application [J]. *Chin J Antitubercul*, 2001,23(2)123-125(In Chinese)
(屠德华.结核菌素实验的应用[J].中国防痨杂志,2001,23(2)123-125)
- [6] Lalvani A, Pathan AA, 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.
- [7] Xie MF, Zhong SC, Zhong YZ. New registration smear tuberculosis patients family closely contacted screening analysis [J]. *China Trop Med*, 2008, 7 (4) : 619-620(In Chinese)
(谢美凤,钟思财,钟耀宗.新登记涂阳肺结核患者家庭密切接触者筛查分析[J].中国热带医学,2008,8(4):619-620)
- [8] Lin DW, Lan J, Lebanon and shape. The smear-positive pulmonary tuberculosis patients family contacts of disease research [J]. *China General Med*, 2010, 13 (1 c) : 313-315(In Chinese)
(林定文,兰江,黎国彤.涂阳肺结核病人家庭接触者发病的研究[J].中国全科医学,2010,13(1C):313-315)

收稿日期:2013-03-05 编辑:崔宜庆