

· 临床研究 ·

结核感染 T 细胞斑点试验与脑脊液细胞学快速诊断结核性脑膜炎的临床价值

王鑫, 买尔旦·阿不来

新疆维吾尔自治区胸科医院 ICU, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: **目的** 分析结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT. TB)与脑脊液细胞学(CSFc)快速诊断结核性脑膜炎(TBM)的临床价值。**方法** 选取 2016 年 3 月至 2018 年 2 月确诊的 TBM 患者 47 例为 TBM 组,非 TBM 患者 30 例为对照组。对两组取外用抗凝血分离制备外周血单个核细胞(PBMC)悬液进行 T-SPOT. TB 检测,并进行脑脊液常规生化(蛋白、糖、氯化物含量)与细胞学检查(白细胞计数、嗜中性粒细胞比率、淋巴细胞比率、单核细胞比率),采用酶联免疫法(ELISA)检测脑脊液中 γ -干扰素(IFN- γ)水平。**结果** TBM 组 T-SPOT. TB 阳性率为 70.21%,明显高于对照组的 13.33% ($P < 0.01$);TBM 组 T-SPOT. TB 实验 ESAT-6 和 CFP-10 抗原斑点形成细胞数及脑脊液中 IFN- γ 水平均明显高于对照组(P 均 < 0.05);TBM 组患者 CSFc 检查均呈混合细胞反应,对照组中化脓性脑膜炎患者以中性粒细胞为主,病毒性脑膜炎患者呈淋巴样细胞反应。T-SPOT. TB + IFN- γ 联合检测对 TBM 诊断的敏感度、特异度、阴阳性预测值均明显高于 T-SPOT. TB、IFN- γ 单项检测。**结论** 采用 T-SPOT. TB、脑脊液中 IFN- γ 、CSFc 各项指标早期检测 TBM 患者均有一定的参考价值,在临床上联合以上多种单项检测指标有助于提高 TBM 诊断结果的准确率。

关键词: 结核性脑膜炎; 结核感染 T 淋巴细胞斑点试验; 脑脊液细胞学; γ 干扰素

中图分类号: R 644 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)07-0931-04

Clinical value of tuberculosis infection T cell spot test and cerebrospinal fluid cytology in rapid diagnosis of tuberculous meningitis

WANG Xin, Mailatan Abre

Intensive Care Unit, Chest Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830049, China

Abstract: Objective To investigate the clinical value of rapid diagnosis of tuberculous meningitis (TBM) by T cell spot test for tuberculosis infection(T-SPOT. TB) and cerebrospinal fluid cytology (CSFc). **Methods** Forty-seven TBM patients diagnosed from March 2016 to February 2018 were selected as the TBM group, and 30 non-TBM patients as the control group. The T-SPOT. TB, routine biochemical etiology of cerebrospinal fluid (protein, glucose, chloride content) and cytological examination (white blood cell count, neutrophil ratio, lymphocyte ratio, monocyte ratio) were carried out. The Interferon (IFN)- γ level in cerebrospinal fluid was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The T-SPOT. TB positive rate in TBM group was significantly higher than that in control group (70.21% vs 13.33%, $P < 0.01$). The number of ESAT-6 and CFP-10 antigen spots in T-SPOT. TB and IFN- γ levels of cerebrospinal fluid in TBM group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). CSFc in TBM group showed mixed cell reactions, while neutrophils were predominant in purulent meningitis patients, lymphoid cell reactions were found in viral meningitis patients. The sensitivity, specificity, negative and positive predictive values of detection of T-SPOT. TB combined with IFN- γ were significantly higher than those of detection of T-SPOT. TB and IFN- γ separately. **Conclusions** Early detection of TBM patients with T-SPOT. TB, IFN- γ and CSFc in cerebrospinal fluid has certain reference value. Combining the above single detection indicators can improve the accuracy of TBM diagnosis.

Key words: Tuberculous meningitis; T-lymphocyte spot test for tuberculosis infection; Cerebrospinal fluid cytology; Interferon- γ

Fund program: Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2018D01C099)

结核性脑膜炎(TBM)约占肺外结核病的 10%,是全身结核病的 10~20 倍,发展中国家的病死率是发达国家为 2~3 倍^[1]。此外,25%的 TBM 存活者会遗留永久性神经系统损害。同时早期的临床表现、体征不显著,病情发展快,故需要寻找一种简便、特异度、敏感度高的早期诊断方法。近年来,新兴的脑脊液细胞学(CSFc)通过分析脑脊液细胞形态学可快速诊断中枢神经系统感染性疾病的病因^[2]。结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT. TB, 酶联免疫斑点法)作为诊断结核病的新技术,已成为早期诊断 TBM 的新辅助方法^[3-4]。本研究应用 T-SPOT. TB 及 CSFc 分析 TBM 患者脑脊液中 γ -干扰素(IFN- γ)及生化指标水平的动态变化,旨在评估这两种诊断方法快速诊断 TBM 患者的临床应用价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 3 月至 2018 年 2 月在我院确诊的 TBM 患者 47 例为 TBM 组。纳入标准:(1)符合 TBM 诊断标准^[5];(2)头颅 CT 检查发现脑积水、脑梗死等征象,伴局灶性神经损伤;(3)脑脊液结核杆菌培养或染色阳性;(4)存在肺结核;(5)临床表现为头痛、颅内压增高等。排除标准:(1)其他神经系统疾病;(2)有肝、肾功能衰竭史者;(3)临床资料不完整者,或中途退出者。其中男 25 例,女 22 例;年龄 45~74(36.23 \pm 8.48)岁。同时选择非 TBM 患者 30 例为对照组,其中男 16 例,女 14 例;年龄 43~74(35.58 \pm 8.29)岁;17 例化脓性脑膜炎,13 例病毒性脑膜炎。两组对象的年龄、性别比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 外周血采集与检测 采集入选患者 5 ml 抗凝外周血用淋巴细胞分离液进行分离,制备外周血单个核细胞(PBMC)悬液待检。采用 T 淋巴细胞结核感染诊断试剂盒(南通表源生物),按说明书操作,检测上述 PBMC 制备的悬液。将 50 μ l 细胞培养液阴性对照加入在已包被的抗 IFN- γ 抗体板孔中,阳性对照为 50 μ l 植物血凝素,各 50 μ l 结核分枝杆菌特异混合多肽 A 和 B,将上述 100 μ l 悬液分别加入早期分泌性靶抗原-6(ESAT-6)和培养滤液蛋白-10(CFP-10)置于含 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 18 h,用 PBS 洗 4 次,加入小鼠抗人 IFN- γ 单克隆抗体于 2~8 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗 4 次,加入显色液,25 $^{\circ}$ C 静置 7 min。根据结核分枝杆菌特异性抗原 A(ESAT-6)和抗原 B(CFP-10)的斑点判读结果:(1)观察孔斑点数-阴性对照孔斑点数(0~5) \geq 6 个;(2)观察孔斑点数

\geq 2 倍的阴性对照孔斑点数(\geq 6 个);即为阳性。T-SPOT. TB 的实验结果用斑点形成细胞的数目描述。

1.2.2 脑脊液采集与检测 所有研究对象入院 2 d 内首次腰穿收集脑脊液 1 ml 进行脑脊液常规生化(蛋白、糖、氯化物含量)与细胞学检查(白细胞计数、嗜中性粒细胞比率、淋巴细胞比率、单核细胞比率)。室温下 2 500 rpm 离心 10 min,取上清液-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。观察脑脊液色泽,取 0.1~0.5 ml 脑脊液采用 LX-700 微型玻片离心机低速离心、收集、MGG 染色,干燥后细胞学分类计数。

1.3 单项检测和联合检测对 TBM 的诊断效能比较

对外周血 PBMC 的 T-SPOT. TB 实验、脑脊液 IFN- γ 水平检测以及两者联合检测对 TBM 的诊断效能进行分析和对比。另外,脑脊液 IFN- γ 水平(IFN- $\gamma > 15$ pg/ml 为异常感染,阳性标准)严格按照上海吉泰依科赛提供的试剂盒说明书操作,采用酶联免疫法(ELISA)测定。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析及两两比较的 LSD- t 检验;计数资料以例(%)表示,采用 χ^2 检验;采用敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值评价诊断效能。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T-SPOT. TB 检测结果比较 对照组患者中,T-SPOT. TB 阳性为 4 例(13.33%),TBM 组 T-SPOT. TB 阳性为 33 例(70.21%),TBM 组明显高于对照组,差异有统计学意义($\chi^2 = 48.22, P < 0.01$);TBM 组 ESAT-6 和 CFP-10 抗原斑点形成细胞数均明显多于对照组($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 脑脊液细胞学检查结果比较 TBM 组患者 CSFc 检查均呈混合细胞反应。将对照组分为化脓性脑膜炎及病毒性脑膜炎两个亚组,化脓性脑膜炎组患者以中性粒细胞为主,病毒性脑膜炎组患者呈淋巴样细胞反应。各组对象的白细胞计数、嗜中性粒细胞比率、淋巴细胞比率、单核细胞比率总体比较及两两比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 2。

表 1 T-SPOT. TB 检测结果与脑脊液 IFN- γ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ESAT-6 (个/ $\times 10^6$ 个 PBMC 细胞)	CFP-10 (个/ $\times 10^6$ 个 PBMC 细胞)	IFN- γ (pg/ml)
TBM 组	47	138.35 \pm 18.81	119.12 \pm 11.05	243.23 \pm 38.23
对照组	30	20.35 \pm 3.24 ^a	13.25 \pm 2.28 ^a	10.38 \pm 3.59 ^a

注:与 TBM 组比较,^a $P < 0.05$ 。

表 2 CSF_c 检查结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	白细胞计数 ($\times 10^6/L$)	嗜中性粒细胞比率 (%)	淋巴细胞比率 (%)	单核细胞比率 (%)
TBM 组	47	236.25 \pm 89.26 ^{ab}	51.24 \pm 6.68 ^{ab}	44.22 \pm 6.78 ^{ab}	4.62 \pm 0.65 ^{ab}
对照组					
化脓性脑膜炎	17	1232.15 \pm 228.27 ^a	77.24 \pm 11.12 ^a	21.45 \pm 4.35 ^a	1.23 \pm 0.17 ^a
病毒性脑膜炎	13	126.33 \pm 47.27	4.43 \pm 1.11	85.78 \pm 11.36	8.62 \pm 0.94

注:与病毒性脑膜炎组比较,^a $P < 0.05$;与化脓性脑膜炎组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 3 脑脊液生化检查结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	蛋白含量 (g/L)	糖含量 (mmol/L)	氯化物含量 (mmol/L)
TBM 组	47	2.54 \pm 0.55 ^{ab}	2.41 \pm 0.61 ^{ab}	103.32 \pm 6.33 ^{ab}
对照组				
化脓性脑膜炎组	17	3.45 \pm 0.66 ^a	1.92 \pm 0.52 ^a	109.37 \pm 7.02 ^a
病毒性脑膜炎组	13	0.83 \pm 0.17	3.62 \pm 1.12	129.69 \pm 8.64

注:与病毒性脑膜炎组比较,^a $P < 0.05$;与化脓性脑膜炎组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 4 单项检测或联合检测对 TBM 的诊断效能比较 (%)

组别	敏感度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
T-SPOT. TB 阳性	33(70.21)	41(87.23)	37(78.72)	38(80.85)
IFN- γ 阳性	39(82.98)	40(85.11)	41(87.23)	81(13.33)
T-SPOT. TB + IFN- γ 均阳性	43(93.61)	47(100.00)	45(95.74)	47(100.00)

TBM 组脑脊液 IFN- γ 水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 脑脊液生化检查结果比较 化脓性脑膜炎组脑脊液蛋白含量最高,糖含量最低,TBM 组氯化物含量最低,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。见表 3。

2.4 单项检测和联合检测对 TBM 的诊断效能比较

T-SPOT. TB + IFN- γ 联合检测对 TBM 诊断的敏感度、特异度、阴性预测值均明显高于 T-SPOT. TB、IFN- γ 单项检测。见表 4。

3 讨论

目前 TBM 诊断的金标准仍为病原学诊断,但 TBM 脑脊液中结核分枝杆菌数量少,灵敏度较低,以及杆菌培养周期长,延误 TBM 的早期诊断和治疗^[6]。故急需寻找新的快速、高敏感度、高特异度的诊断方法,来提高 TBM 的早期诊断率。TBM 细胞学有特殊变化,CSF_c 可精确的、科学的对脑脊液中细胞分类,高效地判断感染情况。有文献资料表明,大部分 TBM 患者脑脊液中既有中性粒细胞,也有激活单核细胞与淋巴细胞,呈典型的混合细胞反应^[7-8]。徐仿成等^[9]研究发现 TBM 患者 CSF_c 中单核吞噬细胞及巨噬细胞反应呈团块样分布形,其中中性粒细胞比率较高。唐黎黎、吴大鸿等^[10-11]研究发现 TBM 细胞学以嗜中性粒细胞为主,达 50% ~ 80%,并可见数量几乎相当的淋巴样细胞,呈混合性细胞反应。Lee 等^[12]研究认为,单核细胞比率较高是 TBM 的唯一表

现。而本研究 TBM 患者 CSF_c 检查结果与以上文献相似,但发现非结核性中枢神经系统感染患者中化脓性脑膜炎患者以中性粒细胞为主,病毒性脑膜炎组患者呈淋巴样细胞反应,提示 TBM 患者 CSF_c 的表现特异性较低,临床上需要与化脓性脑膜炎鉴别。此外,临床治疗过程中可先给予患者抗生素规范治疗 7 d 后复查,若 CSF_c 嗜中性粒细胞比率明显降低,则考虑为 TBM,继续治疗 3 周后,其各细胞比率无明显改变,则确诊 TBM^[13]。此外,本研究对 TBM 脑脊液生化指标进行检查,发现 TBM 患者的蛋白含量明显较高,而糖含量、氯化物含量较低,有助于定性评估检测者感染情况,具有一定的指导价值。

我国是结核高发地区,卡介苗接种普遍,但 T-SPOT. TB 检测应用在 TBM 中较少。近年来,多项临床资料表明,在 TBM 进展过程中一些蛋白和细胞因子会发生明显变化^[14]。其中由结核杆菌早期分泌的 ESAT-6、CFP-10 均是分子量较低的蛋白,在 TBM 中能特异性表达,不受接种卡介苗的影响,在大部分非结核分枝杆菌中不表达^[15]。王娟娟等^[16]研究显示, TBM 诊断中, T-SPOT. TB 的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 89.66%、75.00%、74.29%、90.00%; Kang 等^[17]发现 T-SPOT. TB 与涂片阴性 PTB 患者的细菌培养之间的一致率为 25.6% (22.7% ~ 28.5%)。T-SPOT. TB 的阳性率高于涂片阴性 PTB 患者的细菌培养阳性率, T-SPOT. TB 与细菌培养几乎没有一致性。此外,蔡莎莎等^[18]研究表明 TBM 患者脑脊液中 ESAT-6、CFP-10 水平显著高于非结核感染者。由活化的 T 细胞分泌的 INF- γ 免疫应答因子,发挥抗感染、抗肿瘤活性和免疫调节作用,高水平虽能加强免疫反应,但也会严重损伤中枢神经系统,同时增强机体清除体内的结核分枝杆菌^[19-20]。本研究显示, TBM 患者 T-SPOT. TB 阳性率 70.21% 明显高于非结核感染者的 13.33%, TBM 组 ESAT-6 和 CFP-10 抗原斑点形成平均细胞数均较多。T-SPOT. TB 或 IFN- γ 在 TBM 中单独检测已有较多报道,王娟娟等^[21]研究显示 ESAT-6 和 IFN- γ 联合检测的灵敏性、特异性和准确性分别较单项 ESAT-6、单项 IFN- γ 检测明显提高。本研究结果显示, T-SPOT. TB

+ IFN- γ 的敏感度、特异度、阴阳性预测值均明显高于 T-SPOT. TB、IFN- γ 指标单项检测。最后本研究也发现, TBM 患者首次脑脊液 IFN- γ 水平明显高于病毒性脑膜炎和化脓性脑膜炎患者, 提示在结核分枝杆菌抗原作用下 TBM 患者脑脊液可大量分泌 IFN- γ , 可能由于 TBM 的局部细胞免疫功能增强, 有利于指导诊断 TBM 患者与非 TBM 患者, 具有一定的临床指导价值^[21-22]。

综上所述, 采用 T-SPOT. TB、脑脊液中 IFN- γ 、CSF κ 各项指标早期检测用于 TBM 的诊断均有一定的参考价值, 在临床上联合以上多种单项检测指标有助于提高 TBM 诊断结果的准确率以及评估病情进展。本研究入选患者数相对较少, 病情严重程度存在差异, 不能有效控制检测指标的时间, 影响结果的准确性, 有待扩大样本量进一步验证。

参考文献

[1] 杨丰兵, 贾龙斌, 郭紫瑄, 等. 脑脊液细胞学联合炎性因子检测在结核性脑膜炎中的应用[J]. 山西医药杂志, 2017, 46(17): 2113-2115.

[2] 张庆, 马爱蕊, 何红彦, 等. 中枢神经系统感染性疾病的脑脊液细胞学分析[J]. 河北医科大学学报, 2016, 37(6): 644-646, 651.

[3] Jiang B, Ding H, Zhou L, et al. Evaluation of interferon-gamma release assay(T-SPOT. TB) for diagnosis of tuberculosis infection in rheumatic disease patients[J]. International Journal of Rheumatic Diseases, 2016, 19(1): 38-42.

[4] 李明琴, 杨红. T-SPOT-TB 检测法在结核性脑膜炎早期诊断中的应用分析[J]. 医学综述, 2016, 22(23): 4753-4755.

[5] 吴小慧, 汪峰, 孙自鏞. T-SPOT. TB 试验中 TBAg/PHA 比值在结核性脑膜炎早期诊断中的应用[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13(1): 20-22.

[6] 王智存, 白广红, 王新宏, 等. 结核性脑膜炎实验室检测新进展的临床评价[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(z1): 119-121.

[7] Jipa R, Olaru ID, Manea E, et al. Rapid clinical score for the diagnosis of tuberculous meningitis: A retrospective cohort study[J]. Ann Indian Acad Neurol, 2017, 20(4): 363-366.

[8] 陆建红, 吴奕征, 杨勇, 等. 结核 T 细胞酶联免疫斑点试验诊断结核性脑膜炎的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(6): 816-818.

[9] 徐仿成, 王兴中, 陈先文. 结核性脑膜炎脑脊液细胞学的特征性表现[J]. 脑与神经疾病杂志, 2009, 17(1): 52-54.

[10] 唐黎黎, 吴元波, 方传勤, 等. 结核性脑膜炎脑脊液细胞学动态分析[J]. 安徽医药, 2016, 20(6): 1130-1132.

[11] 吴大鸿, 何玲, 李铁东, 等. 老年结核性脑膜炎脑脊液细胞学变化特点及临床意义[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(1): 64-66.

[12] Lee HW, Lee YJ, Kim SJ, et al. Comparing tuberculin skin test and interferon γ release assay (T-SPOT. TB) to diagnose latent tuberculosis infection in household contacts[J]. Korean J Intern Med, 2017, 32(3): 486-496.

[13] 陶叶海, 杨小林, 金法祥, 等. T 淋巴细胞 γ -干扰素释放试验在结核病诊断中的应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(18): 4081-4084.

[14] 高岭, 申改青, 王有峰, 等. 结核性脑膜炎患儿生化及脑脊液检测结果与预后的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(11): 2610-2613.

[15] Shekhawat SD, Purohit HJ, Taori GM, et al. Evaluation of host Hsp (S) as potential biomarkers for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2016, 140: 47-51.

[16] 王娟娟, 马利. 不同检测方法在结核性脑膜炎诊断中的应用价值[J]. 中国医药导报, 2017, 14(16): 119-122.

[17] Kang WL, Wu MY, Yang KY, et al. Factors associated with negative T-SPOT. TB results among smear-negative tuberculosis patients in China[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 4236.

[18] 蔡莎莎, 邹金艳, 叶丽君, 等. 结核性脑膜炎患者早期分泌性抗原-6 和特异度抗原培养滤液蛋白-10 水平变化及意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(15): 76-78, 82.

[19] 唐洁, 陈策, 查成, 等. 基于结核杆菌耐热抗原小分子多肽刺激人外周血 T 细胞产生 TNF- α 和 IFN- γ 鉴别肺结核和潜伏性结核感染[J]. 南方医科大学学报, 2017, 37(11): 1442-1447.

[20] 林岚, 唐浩, 梅茸, 等. 脑脊液 IFN- γ 、CRP 水平对早期诊断中枢神经感染的价值[J]. 中国临床研究, 2017, 30(3): 313-316.

[21] 王娟娟, 马利. ESAT-6 和干扰素- γ 表达水平在结核性脑膜炎诊断中的应用价值[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(2): 153-156.

[22] 赵旭, 刘宁. T 细胞 γ -干扰素释放试验对肺结核的诊疗价值[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(3): 348-349, 360.

[23] 张培莉, 刘义庆, 邵婧, 等. 结核感染 T 淋巴细胞 IFN- γ 释放实验临床检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 22-25, 29.

收稿日期: 2018-10-08 修回日期: 2018-12-02 编辑: 王娜娜