

3 种结核抗体检测方法在肺结核辅助诊断中的价值*

黄正谷¹, 付晓¹, 钟敏², 王静¹, 赵攀³, 李同心^{1△} (重庆市公共卫生医疗救治中心: 1. 检验科; 2. 结核病重点实验室; 3. 科教科 400036)

【摘要】目的 探讨酶联免疫吸附试验、胶体金法和蛋白芯片法 3 种结核抗体检测方法在耐多药肺结核辅助诊断中的价值。**方法** 收集重庆市公共卫生医疗救治中心检验科 2012 年 2 月 1 日至 9 月 30 日耐多药肺结核患者血清标本共 106 例, 并同时采用 3 种方法检测结核抗体, 统计检测结果并进行分析。**结果** 3 种方法阳性率由高到低依次为: 胶体金法、蛋白芯片法、酶联免疫吸附试验。胶体金法和酶联免疫吸附试验两种方法 Kappa 系数最低, 酶联免疫吸附试验和蛋白芯片法差异无统计学意义意义 ($P > 0.05$)。蛋白芯片法中脂阿拉伯甘露糖抗体和抗结核 38KDa 抗体阳性组合模式最常见。**结论** 结核金标法和蛋白芯片法联合检测血清中结核抗体对耐多药肺结核具有较高的辅助诊断价值。

【关键词】 耐多药肺结核; 酶联免疫吸附试验; 胶体金法; 蛋白芯片法; 辅助诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.14.026 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)14-1949-02

耐药结核病已成为全球结核病控制工作面临的严峻挑战, 严重威胁人类身体健康。全球每年新产生耐多药结核病患者约 50 万, 广泛耐药结核病患者约 5 万, 耐药结核病对全球公共卫生构成巨大威胁。近几年来随着结核分枝杆菌数种特异性抗原的发现与纯化, 实验技术不断发展与改进, 采用酶联免疫吸附试验、胶体金法或蛋白芯片法测定患者血清中结核抗体用以辅助诊断活动性肺结核已在临床广泛使用, 其敏感性和特异性都在不断提高^[1-3]。因所用抗原及技术各不相同, 各种方法及试剂间仍有较大差异, 而且在耐多药肺结核中评价多种方法检测结核抗体的文献报道较少。本文探讨了 3 种结核抗体检测方法在耐多药肺结核中应用的对比观察, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 收集重庆市公共卫生医疗救治中心 2012 年 2 月 1 日至 9 月 30 日结核科住院患者 (临床明确诊断为耐多药肺结核) 血清标本 106 例及实验相关资料, 其中男 70 例, 女 36 例, 年龄 15~79 岁, 平均 (40.0 ± 13.5) 岁。

1.2 仪器与试剂 结核抗体酶联免疫吸附试验试剂盒由成都永安制药有限公司生物制品部提供; 结核分枝杆菌 IgG [包括抗结核脂阿拉伯甘露糖 (LAM) 抗体、抗结核 16KDa 抗体和抗结核 38KDa 抗体] 检测试剂盒 (蛋白芯片) 由南京大渊生物技术公司提供; 结核抗体胶体金法诊断试剂盒由上海奥普生物医学有限公司提供。结核分枝杆菌蛋白芯片阅读仪由南京大渊生物技术工程有限公司生产。GF-M3000 型酶标仪由山东彩虹仪器有限公司生产。PW-960 型自动酶标洗板机由深圳市汇松科技发展有限公司生产。

1.3 检测方法 对收集的 106 例血清标本分别采用 3 种方法进行抗体检测, 具体检测方法按说明书操作。

1.4 统计学方法 数据用 SPSS13.0 软件进行分析, 计数资料采用 χ^2 检验, 对不同方法两两进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义; Kappa 值反映不同级别的一致性。

2 结果

2.1 3 种方法检测 106 例血清标本结果比较 见表 1。

表 1 3 种方法检测阳性结果 ($n=106$)

检测方法	阳性例数	阴性例数	阳性率 (%)
酶联免疫吸附试验	71	35	66.98
蛋白芯片法	78	28	73.58
胶体金法	90	16	84.91

2.2 3 种方法检测 106 例血清标本的结果模式 见表 2。

表 2 3 种方法检测 106 例血清标本的结果模式

酶联免疫吸附试验	蛋白芯片法	胶体金法	$n(\%)$
+	+	+	65(61.32)
-	-	-	13(12.26)
-	+	+	11(10.38)
-	-	+	10(9.43)
+	-	+	4(3.78)
+	+	-	2(1.89)
-	+	-	1(0.94)

注: + 表示阳性, - 表示阴性。

2.3 3 种方法检测 106 例血清标本的相关性和一致性分析结果 见表 3。

表 3 3 种检测方法相关性比较

检测方法	P	Kappa 值
酶联免疫吸附试验 + 蛋白芯片法	$>0.05(1.11)$	0.638
蛋白芯片法 + 胶体金法	$<0.05(4.13)$	0.512
胶体金法 + 酶联免疫吸附试验	$<0.05(9.32)$	0.401

2.4 蛋白芯片法检测 106 例结核分枝杆菌 IgG 抗体的构成比 见表 4、5。

* 基金项目: 重庆市卫生局医学科研重点项目 (2012-1-085)。

△ 通讯作者: E-mail: 9608277@qq.com。

表 4 106 例结核分枝杆菌 IgG 抗体构成

LAM 抗体	16KDa 抗体	38KDa 抗体	n(%)
+	-	+	68(64.15)
-	-	-	28(26.41)
+	+	+	8(7.55)
-	+	-	2(1.89)

注: +表示阳性, -表示阴性。

表 5 蛋白芯片法检测 106 例结核分枝杆菌 IgG 抗体阳性结果

IgG 抗体	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
LAM 抗体	76	30	71.70
16KDa 抗体	10	96	9.43
38KDa 抗体	76	30	71.70

3 讨 论

耐多药结核病的增多是造成全球结核病疫情回潮的众多原因之一,也是我国结核病疫情控制不利的主要原因。特异性高、敏感性高、能早期检测并全程跟踪结核病的检测技术是最理想的诊断方法。血清学抗体免疫检测技术是众多结核病诊断方法中的一种,该技术简便快速、特异性和敏感性较高,对肺结核、肺外结核的诊断与鉴别诊断具有重要参考依据。本文旨在分析酶联免疫吸附试验、胶体金法及蛋白芯片法 3 种抗体检测方法在耐多药肺结核中的辅助诊断价值。

结核抗体酶联免疫吸附试验诊断试剂盒采用酶联免疫间接法检测样本中结核分枝杆菌特异性蛋白(TB-SA)结核抗体 IgG。TB-SA 是一种特异性较高的结核分枝杆菌分泌抗原,容易被机体免疫系统识别而产生特异性抗体^[4]。有学者利用 TB-SA 结核抗体检测诊断结核病的阳性率为 67.8%,特异性为 76.6%,阳性预测值为 83.0%。有学者在检测活动性结核病患者中, TB-SA 抗体检测阳性率为 74.8%,阳性预测值为 92.3%。本文检测耐多药肺结核病阳性率为 66.98%(表 1),与前 2 位学者的结果较接近。

血清 TB-SA 抗体检测不受结核菌素试验的影响,在检测结核病无痰或菌阴肺结核、肺外结核特异性高,有较大的应用价值^[5]。

结核抗体胶体金法采用的是斑点免疫金胶体渗滤技术。该试剂盒原理是以结核特异性外膜成分 LAM 为标记抗原,点样并固化在硝酸纤维素膜上,膜上的标记抗原捕获人血清中的结核分枝杆菌抗体,被捕获的结核 IgG 抗体可特异性结合葡萄球菌 A 蛋白胶体金缀合物标记呈色,形成红色斑点。莫凤明等^[6]采用胶体金法检测结核病的灵敏度及特异性分别是 52.3%、88.5%。有学者采用胶体金法检测复治肺结核患者血清结核抗体阳性率为 81.3%,与胶体金法检测耐多药肺结核病阳性率大致相同。

结核蛋白芯片法是近几年出现的新技术,临床上现已使用较多。蛋白芯片法是以微孔滤膜为载体,利用微阵列技术将纯化的 LAM、重组蛋白抗原 16KDa 和 38KDa 3 种抗原固相于同一滤膜上,当加入血清标本经抗原抗体反应后,加入显色系统,再利用专门的芯片阅读仪和软件分析显色后的芯片,由不同抗

原点阵灰度值对多种结核抗体同步检测。蛋白芯片法操作简单、快速,结果判读不受人为因素干扰,有相对客观的准确度。LAM、抗原 16KDa 和 38KDa 均为结核分枝杆菌特异性较高的抗原,其中 LAM 是分枝杆菌属细胞壁的重要组成部分,其检测灵敏度较高,抗原 16KDa 和 38KDa 是结核分枝杆菌复合群所特有的抗原,与非结核分枝杆菌不存在交叉反应,其诊断特异性较高。抗 38KDa 蛋白抗体、抗 LAM 抗体与结核活动性密切相关,联合检测血清中抗 38KDa 蛋白抗体和抗 LAM 抗体,可将活动性肺结核和稳定性肺结核可靠区别开来^[7]。利用蛋白芯片法检测耐多药结核病对于传染性肺结核患者的分类收治和科学管理,防止医院交叉感染、准确评估疗效和确保医疗安全具有重要意义。

从本实验结果来看,耐多药肺结核在蛋白芯片法 3 种抗体检测以 LAM 和 38KDa 最灵敏,16KDa 较差,联合检测以 LAM 和 38KDa 二者阳性组合模式最为常见。朱同华^[8]在 374 例各型肺结核血清结核抗体蛋白芯片检测的敏感度为 83.0%,特异性为 96.5%。林秋等^[9]采用蛋白芯片法检测 40 例已确诊肺结核患者的敏感度为 92.5%,特异性为 95.0%。与前二者比较,该方法结果稍低,这可能与本文检测的耐多药肺结核患者免疫功能低下或免疫损害有关^[10],导致假阴性产生。黄绍梅等^[11]统计了 90 例蛋白芯片法检测儿童结核病的灵敏度为 46.7%,特异性为 90.0%,而且开展 16 KD 抗体的并列检测,可以提高 38 KDa 指标检测的灵敏度^[12]。因此,根据蛋白芯片的组合结果可以区分是结核菌感染还是卡介苗接种导致结核菌素试验产生阳性。有学者在 200 例临床确诊结核患者中,分别采用了由南京大渊生物技术工程有限公司提供的结核分枝杆菌抗 LAM、抗 16KDa 和 38KDa 抗体蛋白芯片及检测系统;由西安联尔科技有限公司提供的结核分枝杆菌抗 CFP10、ESAT-6 抗体蛋白芯片及检测系统,检测结果总敏感性为 35.5%,但检测非结核患者的特异性达到 92.0%。竺澎波等^[13]采用西安联尔科技有限公司提供的结核分枝杆菌抗 LAM、抗 16KDa 和 38KDa 抗体蛋白芯片及检测系统,实验敏感性为 71.2%,特异性为 84.8%。

由表 1 可见,胶体金法阳性率高于蛋白芯片法,酶联免疫吸附试验最低。由表 2 可见,3 种方法结果一致(皆阳性或皆阴性)占 73.6%,任何两种方法结果一致占 16.0%,仅一种方法阳性的病例比例最高的是胶体金法。在本研究中胶体金法和酶联免疫吸附试验两种方法 Kappa 值最低,有一般的一致性,酶联免疫吸附试验和蛋白芯片法差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白芯片法中 LAM 抗体、38KDa 抗体阳性率均较 16KDa 抗体高,LAM 和 38KDa 抗体阳性组合模式最常见。有学者研究指出,肺结核组结核蛋白芯片阳性率为 66.4%,在结核病中 3 项蛋白芯片抗体指标灵敏性依次为抗 LAM、38KDa 抗体和抗 16KDa 抗体,本研究结果可见抗 LAM 和 38KDa 抗体灵敏度相似,这种情况可能与二者选择的检测对象范围不同有关系。有学者认为 CT 显示多个肺野结核的蛋白芯片阳性率高于单个肺野结核,有基础疾病较无基础疾病检出率低,前者可能与病变范围大小有关,范围越大,变态反应越强,产生的抗体滴度越高有关;后者与有基础疾病患者免疫力有关,免疫力相对较低时产生的抗体滴度就越低。

综上所述,结核抗体酶联免疫吸附试验(下转第 1953 页)

表 6 脐带血中 CD34⁺ 细胞和 HPC 细胞检测结果 (%)

项目	样本									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CD34 ⁺	0.43	0.13	0.77	0.28	0.37	0.15	0.62	0.26	0.30	0.56
HPC	0.26	0.06	0.57	0.13	0.21	0.07	0.49	0.13	0.15	0.36

3 讨 论

按照 ISO15189 质量体系认可的要求,在仪器应用于临床前必须对仪器的可靠性进行评估,这是 Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪应用于临床的质量基础。作者实验室通过试验设计,对 Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪手动与自动模式进行了性能评估。从试验结果看, Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪具有良好的稳定性。首先 Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪重复性、批内批间精密度都达到性能标准。其次线性良好, WBC、RBC、Hb、HCT、PLT 相关系数全部在 0.999 0 以上。再是 Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪携带污染率小,项目 WBC、RBC、Hb、HCT、PLT 的携带污染率均小于 1%。该性能降低了样本间的交叉污染,使检测结果更加稳定。更重要的是 Sysmex XE-2100 全自动血细胞分析仪不正确度(偏倚)小,可确保检测标本的正确性。

目前常用检测外周血干细胞的方法是用流式细胞仪检测 CD34⁺ 细胞,因其是对造血干细胞的直接检测,可得到高度可靠的数据。然而采用流式细胞仪对 CD34⁺ 细胞进行检测成本高,需要特殊的仪器,用 IMI 通道检测外周血干细胞是间接通过检测原始细胞、幼稚细胞实现的。本试验初步判断二者具有很好的相关性,IMI 通道可以用来评估 CD34⁺ 细胞的数量,(由于本试验样本量较少,相关性可能还需长期评估)这对判断外周血干细胞的数量可提供帮助。

(上接第 1950 页)

操作较复杂、耗时,且阳性率较低。胶体金法操作简单、快速,阳性率较高,但人为判断结果可能会产生误差。蛋白芯片法吸取了前两种方法的优点,而且同时能检测 3 种抗体。因此,在耐多药肺结核患者中开展结核金标法和蛋白芯片法联合检测血清中结核抗体具有较高的辅助诊断价值。

参考文献

[1] 刘尚武,李王平,邹远妮,等. 胶体金与蛋白芯片结核抗体检测方法在结核病辅助诊断中的临床价值[J]. 中华肺部疾病杂志:电子版,2011,4(5):388-391.

[2] 陈红兵,吴丽霞,张娟,等. 蛋白芯片联合检测多种结核抗体在结核病诊断中的应用价值[J]. 中国实验诊断学,2011,15(2):259-262.

[3] 赵雁林,刘志敏. 结核病实验室标准化操作与网络建设[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:73-76.

[4] Salch MT, Belisle JT. Secretion of an acid phosphatase (Sap M) by Mycobacterium tuberculosis that is similar to eukaryotic acid phosphatases [J]. J Bacteriol, 2000, 182(23):6850-6853.

[5] 赵庆蓉,罗涛,朱帆,等. 血清结核分枝杆菌 TB-SA 抗体在结核病诊断中的临床价值[J]. 华西药学杂志,2007,22

综上所述, Sysmex XE-2100 五分类全自动血细胞分析仪性能符合要求,为临床结果的可靠报告提供了坚实的基础。IMI 通道可用来评估脐带血造血干细胞的数量,为其进一步评估外周血造血干细胞数量提供了基础支持。

参考文献

[1] 丛玉隆,乐家新. 现代血细胞分析技术与临床[M]. 北京:人民军医出版社,2005:50-54.

[2] Waiters J, Patricia G. Performance evaluation of the Sysmex XE-2100 hematology analyzer [J]. Lab Hematol, 2000,6(1):83-92.

[3] Lehto T, Hedberg P. Performance evaluation of Abbott CELL-DYN Ruby for routine use [J]. Lab Hematol, 2008,30(5):400-407.

[4] 李彬,陈泽琴. BC-5300 全自动血细胞分析仪性能评价[J]. 检验医学与临床,2012,9(6):644-645.

[5] 中国实验室国家认可委员会技术委员会医学分委员. 医学实验室质量管理与认可指南[M]. 北京:中国计量出版社,2004:148-149.

[6] Nakul AD, Sudaka SL, Ferrero VC, et al. Evaluation of the Sysmex XE-2100 hematology analyzer in hospital use [J]. Clin Lab Anal, 2003,17(4):113-123.

[7] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:142-167.

[8] 毕波,吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.

(收稿日期:2013-12-23 修回日期:2014-02-03)

(5):591-593.

[6] 莫凤明,刘爱菊,张璐. 血清结核杆菌抗体胶体金法的应用价值[J]. 检验医学与临床,2012,9(9):1118-1119.

[7] 董梅,郭宁,匡铁吉,等. 结核病感染状况与抗体特征研究[J]. 中国实验诊断学,2007,11(9):1186-1187.

[8] 朱同华. 血清结核抗体蛋白芯片检测与痰抗酸染色实验室分析[J]. 实验与检验医学,2010,28(5):496.

[9] 林秋,温先勇,张春红. 蛋白芯片法检测结核分枝杆菌抗体及其临床应用[J]. 医学理论与实践,2011,24(17):2095-2096.

[10] 张贺秋,赵雁林. 现代结核病诊断技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:93-96.

[11] 黄绍梅,邱薇,许柳清. 蛋白芯片法检测结核抗体在儿童结核病中的诊断价值[J]. 广东医学,2012,33(16):2421-2422.

[12] 李奇志,朱朝敏,詹学,等. 检测血清中抗结核抗体辅助诊断儿童结核病[J]. 重庆医学,2005,34(2):206-207.

[13] 竺澎波,陈虹,高鸣. 结核蛋白芯片在肺结核诊断中的应用价值[J]. 实用医学杂志,2012,28(15):2593-2595.

(收稿日期:2014-01-04 修回日期:2014-03-10)