



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104198693 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201410371436. 1

(22) 申请日 2014. 07. 31

(71) 申请人 温州市中心医院

地址 325000 浙江省温州市解放街北路大筒巷 32 号

(72) 发明人 蒋贤高 施伎蝉 朱海燕 黄默荷  
程爱琼 邱彩英

(74) 专利代理机构 温州瓯越专利代理有限公司  
33211

代理人 陈加利

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种 T 淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 T 淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法, 包括以下步骤: 采用英国 Oxford Immunotec 公司生产的 T-SPOT. TB 试剂盒, 取枸橼酸钠抗凝静脉血 5ml, 分离外周血单个核细胞放在包被  $\gamma$ -干扰素抗体的微孔板, 加入结核特异性抗原早期分泌靶向抗原 (ESAT-6) 和培养滤过蛋白 (CFP-10) 作为刺激原, 温箱培养 24h 后, 洗去抗原致敏效应 T 淋巴细胞, 加入生物素标记的二抗, 再经酶联显色, 在细胞因子分泌的地方形成斑点, 通过记录斑点数检测结核特异抗原致敏的效应 T 淋巴细胞数量。本发明方法有助于菌阴肺结核早期筛查。

1. 一种 T 淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法,其特征在于:包括以下步骤:  
采用英国 Oxford Immunotec 公司生产的 T-SPOT. TB 试剂盒,  
取枸橼酸钠抗凝静脉血 5 ml,分离外周血单个核细胞放在包被  $\gamma$ -干扰素抗体的微孔板,加入结核特异性抗原早期分泌靶向抗原 (ESAT-6) 和培养滤过蛋白 (CFP-10) 作为刺激原,温箱培养 24h 后,洗去抗原致敏效应 T 淋巴细胞,加入生物素标记的二抗,再经酶联显色,在细胞因子分泌的地方形成斑点,通过记录斑点数检测结核特异抗原致敏的效应 T 淋巴细胞数量。

## 一种 T 淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于一种生物学检测领域,具体是指一种 T 细胞斑点实验方法。

### 背景技术

[0002] 近年来,结核病的发病率有上升趋势。菌阴肺结核占全部肺结核的 40%~60%,菌阴肺结核病人如果不给予治疗,近一半的病人将发展为涂阳,成为新的传染源。目前许多菌阴肺结核患者没有特异的临床表现,缺乏典型的影像学特征,因而仅靠现有的结核诊断手段,极易漏诊、误诊,对预后不利,容易造成结核难以控制或传播。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是为了克服现有技术存在的缺点和不足,而提供一种 T 淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法,通过该方法有助于菌阴肺结核早期筛查。

[0004] 为实现上述目的,本发明的技术方案是采用英国 Oxford Immunotec 公司生产的 T-SPOT. TB 试剂盒,取枸橼酸钠抗凝静脉血 5 ml,分离外周血单个核细胞放在包被  $\gamma$ -干扰素抗体的微孔板,加入结核特异性抗原早期分泌靶向抗原 (ESAT-6) 和培养滤过蛋白 (CFP-10) 作为刺激原,温箱培养 24h 后,洗去抗原致敏效应 T 淋巴细胞,加入生物素标记的二抗,再经酶联显色,在细胞因子分泌的地方形成斑点,通过记录斑点数检测结核特异抗原致敏的效应 T 淋巴细胞数量。

[0005] 本申请的方法提高了菌阴肺结核早期诊断率,可作为肺结核早期诊断的一项实验室检查方法,较传统的 PPD 试验有更高的敏感性和特异性。T-SPOT. TB 实验的应用使患者得到早期诊断,及时治疗,从而改善菌阴肺结核患者的疗效及预后,控制结核的播散。

[0006] 下面结合具体实施方式对本发明做进一步介绍。

### 具体实施方式

[0007] 下面通过实施例对本发明进行具体的描述,只用于对本发明进行进一步说明,不能理解为对本发明保护范围的限定,该领域的技术工程师可根据上述发明的内容对本发明作出一些非本质的改进和调整。

### 实施例

[0008] 对象与方法

一、对象 2012 年 1 月~2012 年 12 月温州医科大学定理临床学院收住的菌阴肺结核 60 例,同期门诊健康普查者 20 例。所有入组对象均无人免疫缺陷病毒感染、急性病毒感染、妊娠和应用免疫抑制剂等病史。

[0009] 1. 实验组:菌阴肺结核患者 60 例,男 43 例,女 17 例。年龄 20-52 岁,平均  $35.4 \pm 15.3$  岁。其中有细菌学或病理学依据伴有其他部位结核感染者 21 例,其中包括结核性脑膜炎 2 例、结核性胸膜炎 4 例、肾结核 1 例、结核性腹膜炎 2 例、关节结核 3 例和淋巴结

核 9 例;无病理学依据,但通过诊断性抗痨治疗获得痊愈的患者 39 例。入组标准:1 典型肺结核临床症状和胸部 X 线表现。2 抗结核治疗有效。3 临床可排除其它非结核性肺部疾患。4 PPD(5TU) 强阳性;血清抗结核抗体阳性。5 痰结核菌 PCR+ 探针检测呈阳性。6 肺外组织病理证实结核病变。7 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid BALF) 检出抗酸分支杆菌。8 支气管或肺部组织病理证实结核病变。具备 1~6 中 3 项或 7~8 条中任何 1 项<sup>[2]</sup>。

[0010] 2. 对照组:健康普查者 20 例,其中男 14 例,女 6 例。年龄 17-50 岁,平均 33.2±16.3 岁。入组标准:无临床症状、胸部 X 线检查无肺部疾患,无结核病接触史的健康志愿者,经问卷调查来自结核分枝杆菌感染低暴露风险人群。

## [0011] 二、方法

1. T-SPOT. TB 实验:采用英国 Oxford Immunotec 公司生产的 T-SPOT. TB 试剂盒,按厂商说明书操作。

[0012] 1.1 检测步骤:取枸橼酸钠抗凝静脉血 5 ml,分离 PBMC 放在包被 INF- $\gamma$  抗体的微孔板,加入结核特异性抗原早期分泌靶向抗原(ESAT-6)和培养滤过蛋白(CFP-10)作为刺激原,温箱培养 24h 后,洗去抗原致敏效应 T 淋巴细胞,加入生物素标记的二抗,再经酶联显色,在细胞因子分泌的地方形成斑点,通过记录斑点数检测结核特异抗原致敏的效应 T 淋巴细胞数量。

[0013] 1.2 结果判断:当空白对照孔内斑点数 <6 时,任一实验孔斑点数减去空白孔斑点数  $\geq 6$ ,结果即为有反应性;若空白对照孔斑点数 >6,任一实验孔斑点数大于空白孔斑点数的两倍,结果也表示有反应性;若上述标准不符合且阳性质控对照孔正常时检测结果为无反应性。

[0014] 2. PPD 试验:PPD 试剂(成都生物制品研究所生产)0.1 ml (5IU) 缓慢注入左前臂掌侧中央皮内,72 h 观察反应结果。用手指轻摸硬结的表缘,测量硬结的横径和纵径,得出平均直径=(横径+纵径)/2,硬结直径  $\leq 4$  mm 为阴性,5~9 mm 弱阳性,10~19 mm 为阳性, $\geq 20$  mm 或 <20 mm 局部出现水泡和淋巴管炎为强阳性。

[0015] 三、统计学分析采用 SPSS18 软件进行统计学分析。计数资料的比较采用卡方检验或 Fisher 精确检验进行, $p < 0.05$  为差异有统计学意义。

## [0016] 结果

1. T-SPOT. TB 检测法与临床诊断一致率比较。实验组 60 例菌阴肺结核患者 T-SPOT. TB 实验阳性 57 例,阴性 3 例,而 20 例对照组健康普查者 T-SPOT. TB 实验阳性 1 例,阴性 19 例。 $\chi^2 = 0.25$ ,  $P = 0.617$ ,  $P > 0.05$ ,说明 T-spot 检测法与临床诊断无统计学差异,即该法与临床诊断一致率较高。见表 1。

[0017] 表 1. T-SPOT. TB 实验结果(例)

表 1. T-SPOT. TB 实验结果 (例)

T-SPOT. TB 实验	临床诊断		合计	$\chi^2$ (连续性校正)	P 值
	实验组	对照组			
阳性	57	1	58		
阴性	3	19	22		
合计	60	20	80	0.25	0.617*

\*P=0.617, P>0.05.

2. PPD 试验法与临床诊断一致率比较。实验组 60 例菌阴肺结核患者 PPD 试验阳性 36 例, 阴性 24 例, 而 20 例对照组健康普查者 PPD 试验阳性 7 例, 阴性 13 例。  $\chi^2=8.26, P=0.004, P<0.05$ , 说明 PPD 试验法与临床诊断有显著的统计学差异, 即该法与临床诊断一致率差。见表 2。

[0018] 表 2. PPD 试验结果 (例)

表 2. PPD 试验结果 (例)

PPD 试验	临床诊断		合计	$\chi^2$ (连续性校正)	P 值
	实验组	对照组			
阳性	36	7	43		
阴性	24	13	37		
合计	60	20	80	8.26	0.004*

\*P=0.004, P<0.05, 注: PPD 试验结果阳性、强阳性归入阳性组

3. T-SPOT. TB 检测法与 PPD 试验法阳性检出率比较。 58 例 T-SPOT. TB 实验阳性者中 PPD 试验阳性 37 例, 阴性 21 例, 而 22 例 T-SPOT. TB 实验阴性者中 PPD 试验阳性 6 例, 阴性 16 例。  $\chi^2=7.26, P<0.05$ , T-SPOT. TB 检测法与 PPD 试验法阳性检出率比较, 有显著的统计学差异, T-SPOT 法阳性检出率较高。见表 3。

[0019] 表 3. T-SPOT. TB 实验和 PPD 试验比较

表 3. T-SPOT. TB 实验和 PPD 试验比较

PPD 试验	T-SPOT 实验		合计	$\chi^2$ (连续性校正)	P 值
	阳性	阴性			
阳性	37	6	43		
阴性	21	16	37		
合计	58	22	80	7.26	0.007

\*P=0.007, P<0.05.

4. T-SPOT. TB 实验与 PPD 试验的灵敏性、特异度、与诊断一致率比较。T-SPOT. TB 实验诊断菌阴肺结核的敏感性为 95.0%(95%CI89.5%~100%), 特异度为 95.0% (95%CI85.4%~100%), 阳性预测值达 98.3% (95%CI94.9%~100%), 阴性预测值达 86.4% (95%CI72.0%~100%), 与诊断一致率为 95.0%, Kappa 值为 0.871, 大于 0.5, 与临床诊断一致性好。PPD 试验诊断菌阴肺结核的敏感性为 60.0%(95%CI47.6%~72.4%), 特异性为 65.0%(95%CI44.1~85.7%), 阳性预测值为 83.7%(95%CI72.7%~94.8%), 阴性预测值为 35.1%(95%CI19.8%~50.5%), 与诊断一致率为 61.25%, Kappa 值为 0.195, 小于 0.5, 与临床诊断一致性差。见表 4。

[0020] 表 4. T-SPOT. TB 实验与 PPD 试验的特异度、灵敏度、与诊断一致率比较。

诊断方法学	敏感性	特异度	阳性预测值	阴性预测值	与诊断一致率	标准误	Kappa 值
T-SPOT. TB	95.0%	95.0%	98.3%	86.4%	0.95	0.024	0.871
PPD 试验	60.0%	65.0%	83.7%	35.1%	0.6125	0.0545	0.195

[0021] 备注 :Kappa 值大于 0.5, 实验方法一致率较好。

专利名称(译)	一种T淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104198693A</a>	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201410371436.1	申请日	2014-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	温州市中心医院		
申请(专利权)人(译)	温州市中心医院		
当前申请(专利权)人(译)	温州市中心医院		
[标]发明人	蒋贤高 施伎蝉 朱海燕 黄默荷 程爱琼 邱彩英		
发明人	蒋贤高 施伎蝉 朱海燕 黄默荷 程爱琼 邱彩英		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	陈加利		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种T淋巴细胞的酶联免疫斑点试验方法，包括以下步骤：采用英国OxfordImmunotec公司生产的T-SPOT.TB试剂盒，取枸橼酸钠抗凝静脉血5ml，分离外周血单个核细胞放在包被γ-干扰素抗体的微孔板，加入结核特异性抗原早期分泌靶向抗原(ESAT-6)和培养滤过蛋白(CFP-10)作为刺激原，温箱培养24h后，洗去抗原致敏效应T淋巴细胞，加入生物素标记的二抗，再经酶联显色，在细胞因子分泌的地方形成斑点，通过记录斑点数检测结核特异抗原致敏的效应T淋巴细胞数量。本发明方法有助于菌阴肺结核早期筛查。

表2. PPD 试验结果 (例)

PPD 试验	临床诊断		合计	χ <sup>2</sup> (连续性校正)	P 值
	验组	对照组			
阳性	36	7	43		
阴性	24	13	37		
合计	60	20	80	8.26	0.004

\*P<0.004, †P<0.05, 注: PPD 试验结果阳性、强阳性归入阳性组