

• 质量控制与质量保证 •

结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验的质量控制与质量保证

蒋俊

【摘要】 近几年来,结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)在国内外已较多地应用于结核分枝杆菌感染检测或相关性研究。T-SPOT. TB 作为集细胞生物学和免疫学检测技术为一体的新方法,虽然操作并不复杂,但对试验条件、操作技术和质量控制要求很高,其试验体系中外周血单个核细胞(PBMCs)的分离、加入活体细胞的数量、细胞孵育条件和结果判定等的全程质量控制,既是决定试验成败的关键,又是常常易于忽略的“潜在性”问题。作者依据其试验原理和临床实践对试验中常见的 PBMCs 分离呈现的不同状态进行了分析和描述;对 PBMCs 的分离、悬液制备、体外孵育和结果判定的质量控制进行了重点论述,其中就人工 PBMCs 计数误差对试验结果的影响进行了详细阐述。除此,还依据传统的改良牛鲍血细胞计数板白细胞计数法和溶液浓度稀释法溶液浓度与体积成反比的基本原理,结合活体 PBMCs 计数和标准细胞悬液终浓度 $2.5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ 的特殊要求,建立了简易的细胞计数“一步法”和“计算式”,使标准细胞悬液的制备趋于简化。

【关键词】 结核/诊断; γ 干扰素释放试验; 白细胞,单核; 细胞计数; 质量控制

Quality control and quality assurance of T-SPOT. TB JIANG Jun. TB Laboratory of Shenyang Chest Hospital, Shenyang TB Key Laboratory, Shenyang 110044, China
Corresponding author: JIANG Jun, Email: xkyjyjkj@sina.com

【Abstract】 T-SPOT. TB has been widely used to assay the *Mycobacterium tuberculosis* infection all around the world. As a new cell biological and immunological detection technology which its operation isn't complex, T-SPOT. TB also raises a claim strictly on experimental condition, operation technique and quality control. The overall quality control including PBMCs separation, adjusting the number of PBMCs, cell incubation condition and result determination is the key steps to succeed as well as to be ignored. According to the test principle and clinical practice, we described and analyzed the different states of PBMCs separation including PBMCs separation, suspension preparation, incubation and result determination, especially, the error of PBMCs count affected experimental result. In addition, we established “one-step” and “calculation formula” method for PBMCs count according to traditional improved NiuBao leukocyte count plate and solution concentration dilution method, PBMCs count and standard cell suspension final concentration of $2.5 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$.

【Key words】 Tuberculosis/diagnosis; Interferon-gamma release tests; Leukocytes, mononuclear; Cell count; Quality control

根据世界卫生组织 2008 年的评估,全世界大约有 1/3 的人口感染了结核分枝杆菌^[1]。我国是世界 22 个结核病高负担国家之一,结核病控制工作面临巨大挑战。目前对于活动性肺结核的诊断虽然较广泛地应用了分枝杆菌固、液体培养和核酸 DNA(RNA)扩增等技术,但对结核分枝杆菌潜伏感染者的确认,仍面临诸多困难。近些年来,欧美一些国家应用结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验(免疫斑点法)这一技术检测离体 T 细胞对 RD1 序列编码结核分枝杆菌早期分泌性抗原靶分子 6(early secretory antigenic target, ESAT-6)和培养滤液蛋白 10(culture filtrate protein-10, CFP-10)的反应(产生 IFN- γ)来确认潜伏性或活动性结核病(包括肺外结

核)显示了很高的敏感度和很好的特异度^[2-4],受到业内人士的普遍关注。近几年以英国牛津免疫公司研制并生产的结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)试剂盒检测结核分枝杆菌感染的新方法在国内已有较多应用^[5-6]。T-SPOT. TB 作为集细胞生物学和免疫学检测技术为一体的新型检测技术,虽然操作并不复杂,但对实验条件、操作技术和质量控制要求很高。其实验体系中的外周血单个核细胞(PBMCs)分离、加入活体细胞数量、细胞孵育条件、结果判定等全程质量控制,既是决定实验成败的关键所在,又是常常易于忽略的“潜在性”问题,对此实验人员必须充分理解和高度重视。

一、PBMCs 的分离与质量控制

(一) PBMCs 分离的基本原理

T-SPOT. TB PBMCs 的分离方法为密度梯度离心法。密度梯度离心法是依据外周血有形成分中不同类别细胞之间的比重差异而设计的,即应用密度为 $(1.077 \pm 0.001) \text{ g/ml}$ (20°C) 的淋巴细胞分离液(Ficoll),经恰当的离心速度(离心

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.05.016

作者单位:110044 沈阳市胸科医院检验科结核病实验室 沈阳市结核病重点实验室

通信作者:蒋俊,Email: xkyjyjkj@sina.com

力)和离心时间,将密度为(1.075~1.090) g/ml 的淋巴细胞和密度为(1.076~1.090) g/ml 的单个核细胞与密度分别为 1.092 g/ml 的粒细胞、1.093 g/ml 的红细胞和(1.030~1.036) g/ml 的血小板分离开来的方法。此方法可回收 >80% 以淋巴细胞为主的 PBMCs。

(二) PBMCs 分离的不同状态

1. 理想状态:在 Ficoll 分离液确保质量的前提下,在 PBMCs 分离的操作过程中,经过血液稀释和加样离心后,可见离心管由上至下被分为血浆层(含有血小板)、环状乳白色淋巴细胞层、Ficoll 分离液层和红细胞层。通常情况下,在 Ficoll 分离液上部与血浆层毗邻处清晰可见白色浓密且较为集中的 PBMCs 带(淋巴细胞和极少量单核细胞)的理想状态。

2. 非理想状态:在 PBMCs 分离的实践中,由于受离心力、细胞密度均一性、分离液质量等多因素影响,并非所有标本经过分离均呈上述理想状态,时常也会遇到 PBMCs 带相对浅淡,界限不清, Ficoll 液层混浊,呈自上而下渐浅的状态; PBMCs 带浓密,呈微红色(红细胞污染)等非理想状态。这两种状态的呈现主要缘于试验对象(患者)个体和分离液质量的差异。其原因主要有:①生理性或病理性淋巴细胞绝对值减低者,如某些病毒、真菌、寄生虫感染,免疫抑制等患者由于淋巴细胞绝对数量减低(淋巴细胞数 < 1000/ μ l),分离时会呈现淋巴细胞带浅淡,界限不清, Ficoll 液层混浊,呈自上而下渐浅的状态;②生理性或病理性血红蛋白减低者,如妊娠或某些血液病患者、特别是混合性贫血者由于红细胞血红蛋白丢失,细胞异质性增高,从而使其密度减低至接近于淋巴细胞而呈现分离层浓密混浊,色泽微红、淡红甚至红色的非理想状态;③ Ficoll 分离液密度过高或过低均会对细胞在液体中的分布产生重要影响,或淋巴细胞弥散在 Ficoll 分离液中,难以形成细胞带;或绝大多数沉淀于分离液底部(红细胞层上部)。

上述非理想状态会不同程度地干扰 PBMCs 的分离质量。采取相应质控措施,排除干扰因素对于保证细胞分离质量,确保试验结果的准确性非常重要。

(三) PBMCs 分离的质量控制

对于一项实验而言,全程质量控制是使其结果具有可靠性的根本保证^[7]。基于 T-SPOT. TB 检测的是离体后经人工分离并孵育 16~20 h 仍具有免疫活性(经结核分枝杆菌特异性抗原刺激能够活化)的效应 T 细胞,以及其生物学和反应体系的特殊原因,该项试验前、中、后的全程质量控制极为重要。

1. 样本需新鲜:如上所述, T-SPOT. TB 检测的是离体后仍具有免疫活性的效应 T 细胞。这就要求检测标本必须要新鲜,并尽可能在推荐的时间范围内(6 h 内)完成细胞分离工作。极特殊情况,血液标本可置室温保存,但最多不宜超过 24 h。Meier 等^[8]的研究显示,血液室温保存 24 h 和 48 h 后斑点形成细胞的数量下降至初始值的 58%(范围为:25%~100%)和 34%(范围为:10%~76%);应用冷冻保存的 PBMCs 进行检测是可行的,但其敏感度也有所减低。

2. 标本要足量:本试验样本要求为经肝素/肝素锂/肝素

钠抗凝采血管或 BD Vacutainer® CPTTM 柠檬酸钠抗凝细胞真空采血管采集的抗凝静脉血 4~8 ml[2~9 岁儿童为 4 ml,成年人(10 岁以上儿童)为 8 ml]。正常儿童和成人白细胞参考值分别为 $(5.0 \sim 12.0) \times 10^9/L$ 和 $(4.0 \sim 10.0) \times 10^9/L$,其中淋巴细胞比率儿童与成人基本一致,约为 20%~40%^[10]。按此计算 4 ml 和 8 ml 血液经分离回收,理论上可分别获取淋巴细胞约 $(40 \sim 192) \times 10^5/4$ ml 和 $(64 \sim 320) \times 10^5/8$ ml。通常 Ficoll 液的细胞回收率 > 80%,细胞存活率 > 98%,故可获取具有活性的淋巴细胞约 $(31 \sim 151) \times 10^5/4$ ml 和 $(50 \sim 251) \times 10^5/8$ ml。T-SPOT. TB 设计的细胞加入量为每检测孔 $2.5 \times 10^5/100 \mu$ l,4 孔总量为 $10 \times 10^5/400 \mu$ l。据此,平衡患者的个体差异,依从性和操作者的技术水平,儿童和成人样本一般不宜低于 3 ml 和 5 ml。免疫缺陷、免疫抑制患者可适度增加样本采集量。

3. PBMCs 细胞的分离:PBMCs 的分离主要有血液稀释、离心分离、吸取 PBMCs 和 PBMCs 洗涤 4 个步骤。血液稀释的要点在于等量和混匀,准确的等量稀释和稀释液的混匀对于保证不同密度细胞的分离质量是必要的;离心分离的要点在于恰当的离心速度(离心力)和离心时间。本试验设计的离心速度和时间不一定适合所有实验室,操作者可依实验环境(条件)的具体条件作适度调整,恰当的离心速度(离心力)和时间对于回收高质量的 PBMCs 非常重要;PBMCs 吸取的要点在于吸取的部位和吸取量的控制。操作中除要准确吸取白色浓密的 PBMCs 带外,遇自上而下渐浅的 PBMCs 带(层)要尽可能自上而下地吸取,避免过多 PBMCs 的丢失,但吸取总量不宜超过 2 ml;细胞洗涤的要点在于适宜的洗液量和对离心速度(时间)的有效控制。洗液量过多,细胞在设定时间内不易沉底回收;过少则影响细胞的洗涤效果。离心速度和离心时间要与液体数量相适应,速度过高、时间过长,细胞易聚集成团而不易解离;反之,细胞沉降不完全,细胞回收率减低。为方便细胞计数和标准细胞悬液的制备,笔者建议末次洗涤后的液体预留 1010 μ l 为宜,其中 10 μ l 用于细胞的染色和计数,预留所剩 1000 μ l 便于标准细胞悬液的制备。此外,细胞分离液的质量决定细胞分离率的高低。在临床实践中,不仅要使用正规厂商的合格产品,而且应对每一批号或新使用的产品进行最佳实验条件的确定。

二、标准细胞悬液制备与质量控制

T-SPOT. TB 是一种计数结核分枝杆菌特异性效应 T 细胞的酶联免疫斑点(ELISPOT)试验方法。正确地进行 T 细胞计数或校正低淋巴细胞,将会增加得到正确试验结果的机会^[9]。根据实验设计^[10],空白对照(不含有抗原)、阳性对照(植物血凝素, PHA)、抗原 A(ESAT-6)和抗原 B(CFP-10) 4 个试验孔均需加入待检的具有活性的 PBMCs 2.5×10^5 个,即血液标本经过分离回收的 PBMCs 总数要 > 100 万个,标准细胞悬液制备总量要 > 400 μ l。

(一) PBMCs 计数

PBMCs 计数有人工计数法和仪器计数法两种。至今国内尚未见适宜本试验的细胞计数仪,目前多采用人工计数法。人工计数法具有细胞染色和细胞计数一并完成,且可通

过细胞形态和结构特征去除非 PBMCs 干扰的优点。

1. 细胞染色:细胞染色是指经 0.4% 台盼蓝对分离后所收集的 PBMCs 以 4:1 比例进行的活体细胞染色。细胞染色后在 3~5 min 内计数活细胞的比率(损伤或死亡的细胞被染成淡蓝色,活细胞则拒染)。需要强调的是染色时间不可过长,否则部分活体细胞也会着色,致使活细胞计数出现偏差。T-SPOT. TB 试验 PBMCs 的活体染色和计数对于保证试验加入具有活性的 2.5×10^5 个/100 μl PBMCs 至关重要,不可或缺。当细胞活率 $\leq 80\%$ 时,省略此步骤可能会产生假阴性结果。

2. 细胞计数:应用血细胞计数板按其传统的计算方法进行本试验的细胞计数及细胞终浓度的调整(浓缩或稀释)即繁琐又耗时,特别是标本量增大时,操作者常力不从心,不仅误差概率会陡然增加,细胞活率及活性也会因此有所降低,试验质量难以保证。笔者在临床实践中依据传统改良牛鲍计数板白细胞计数法^[11]和溶液浓度稀释(纠正)法溶液浓度与体积成反比的基本原理^[12],结合活体 PBMCs 计数和标准细胞悬液终浓度 2.5×10^5 /100 μl 的特殊要求,建立了标准细胞悬液计算式:“标准细胞悬液(量,单位 μl)=四大方格活细胞数 $\times 2.5$ (换算为每微升细胞数) $\times 5$ (台盼蓝液稀释倍数) $\times 1000$ (预留剩余液,单位 μl)/2500 个(标准细胞悬液每微升应含细胞数)”,并根据该式中的变量数“四大方格活细胞数”和非变量数“2.5、5、1000、2500”,将非变量数的商数 $5(2.5 \times 5 \times 1000/2500=5)$ 视为常数,由此归纳出该式的简化式:“四大方格细胞数 $\times 5$ ”的一步计算法,简称“一步法”。“一步法”在实际工作中可快捷计算出标准细胞悬液总量,解决了细胞计数因繁琐耗时而产生的系列质量问题。其试验步骤为:①将预留 1010 μl 沉淀在管底部的细胞悬起混匀,吸取 10 μl 加入预置 40 μl 的 0.4% 台盼蓝液中充分混匀;②从中吸取 10 μl 滴入改良牛鲍计数板中计数四大方格内拒染的 PBMCs 数;③将四大方格细胞数代入简化式:“四大方格细胞数 $\times 5$ ”,即得这一标本以“ μl ”为单位,终浓度为 2.5×10^5 个/100 μl (2500 个/ μl) 的标准细胞悬液量(举例说明见标准细胞悬液制备)。

3. 细胞计数对结果的影响:细胞计数是 T-SPOT. TB 最为关键的技术环节,其准确与否直接关系试验结果的准确性。譬如,4 个检测孔均准确地加入了 2.5×10^5 个 PBMCs,其检测结果:空白孔斑点数为 0, A 抗原孔斑点数为 6, B 抗原孔斑点数为 6, 阳性对照孔斑点数 > 20 , 依据结果判定标准(见结果判定与质量控制)为阳性(有反应性)。可以认为,这一标本空白对照孔中(本底)的非特异效应 T 细胞数 $< 1/25$ 万。A 和 B 抗原检测孔中的 25 万个 PBMCs 中各有 6 个针对特异性抗原刺激而致敏的效应 T 细胞,约占 PBMCs 的 $1/4$ 万。假如这个标本在计数时有偏差,实际加入的细胞量为 2.0×10^5 个 PBMCs,那么就可能出现空白孔斑点数为 0 ($< 1/25$ 万), A 抗原孔斑点数为 5 (约 $1/4$ 万), B 抗原孔斑点数为 5 (约 $1/4$ 万), 阳性对照孔斑点数 > 20 , 以此而被判定为假阴性(无反应性)结果。再譬如,4 个检测孔均准确地加入了 2.5×10^5 个 PBMCs, 结果空白孔斑点数为 1, A 抗原孔斑点数为 6, B 抗原孔斑点数为 4, 阳性对照孔斑点数

> 20 , 结果为阴性(无反应性)。可以认为,此标本 25 万个 PBMCs 中空白对照孔中(本底)的非特异效应 T 细胞数为 $1/25$ 万, A 抗原孔致敏的效应 T 细胞约为 $1/4$ 万, B 抗原孔致敏的效应 T 细胞约 $1/6$ 万。假如这个标本在计数时也有偏差,实际加入的细胞量为 30 万个,就可能出现空白孔斑点数为 1 (约 $1/25$ 万), A 抗原孔斑点数为 7 (约 $1/4$ 万), B 抗原孔斑点数为 5 (约 $1/6$ 万), 阳性对照孔斑点数 > 20 , 以此而被判定为假阳性(有反应性)结果。

(二)标准细胞悬液制备

如前细胞计数所述,细胞经计数后可按“一步法”计算细胞悬液总量,并按此制备标准细胞悬液。例如,四大方格活细胞数为 203 个,将 203 代入“一步法”的“四大方格细胞数 $\times 5$ ”简式中,即得“ $203 \times 5 = 1015$ ”。在预留所剩的 1000 μl 液体中补入 15 μl 液体即为总液体量 1015 μl , 细胞终浓度 2.5×10^5 /100 μl 的标准细胞悬液。若液体总量低于 1000 μl 者,可采用离心浓缩方法调整液体量至标准细胞悬液量。例如,四大方格细胞数为 174 个, $174 \times 5 = 870$, 可将预留所剩的 1000 μl 液体适度离心后从上清液中吸出 130 μl 即为总液体量 870 μl 的每 100 μl 液体含有 2.5×10^5 个 PBMCs 的标准细胞悬液。也可应用该方法在适度范围内以四大方格细胞数为横坐标,以其对应的液体总量为纵坐标绘制“标准曲线”或“工作表格”,可更加快捷的锁定各标本标准细胞悬液的液体总量,使标准细胞悬液的制备更加简捷。

三、PBMCs 的孵育与质量控制

PBMCs 的孵育是 T-SPOT. TB 试验的核心步骤(此阶段效应 T 细胞分泌并释放 IFN- γ)。该步骤需要特别注意的是对孵育环境(条件)的控制和微生物污染的有效防控。

(一)细胞孵育条件控制

T-SPOT. TB 细胞孵育的基本条件与普通细胞培养相同,其孵育的外部条件均为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 5% CO_2 并保持一定湿度。

1. 孵育期外部温度:效应 T 细胞在孵育期外部温度的恰当和恒定对于维持细胞活性至关重要。细胞对于低温环境可有较长时间的耐受限度,但对于高温却非常敏感,当温度升至 39°C 时,几小时内细胞就会相继死亡。因此,常有人将细胞培养箱温度恒定在 36°C , 其目的就是为了尽可能避免意外温度波动对细胞造成伤害。

2. 细胞培养箱内稳定的 5% CO_2 浓度:细胞培养箱内稳定的 5% CO_2 浓度对于培养液 pH 值的恒定(pH 值为 7.2~7.4),使细胞处于良好的活性状态甚为关键。 CO_2 浓度过高可迅速使培养液的 pH 值降低,相反则升高。细胞培养液过酸或过碱都会对细胞功能产生负面影响,甚至导致细胞死亡。

3. 细胞培养箱内湿度的保持:细胞培养箱内保持一定湿度,可避免培养液水分蒸发,对其维持完整的比例成分,维持旺盛的细胞活性具有重要作用。

如上所述,细胞孵育条件的严格控制对于确保效应 T 细胞活性,获取最佳反应效果至关重要。

(二)细胞孵育无菌控制

无菌操作是 T-SPOT. TB 试验细胞分离、细胞洗涤、细

胞计数和细胞孵育过程的基本要求。假如细胞孵育前无菌操作失控(已有污染),那么细胞孵育的无菌控制即已失去意义。

微生物的污染有导致实验失败的可能。主要因为:①微生物的过度繁殖(产酸)致使培养液 pH 值降低,影响效应 T 细胞的活性,削弱或抑制细胞免疫功能的正常发挥,甚至导致细胞的死亡;②细菌繁殖所产生的菌膜在倾倒培养液时易黏附在培养板孔底,不易通过洗涤去除。菌膜遮盖在聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上着色将干扰斑点计数,影响结果的判定。

另外,实验试剂、细胞孵育板(孔)等所有相关实验器材均应避免污染。

四、结果判定与质量控制

T-SPOT. TB 结果的判定取决于斑点的计数和判定标准。其中斑点的准确计数有赖于斑点的清晰可辨,操作员的娴熟技术和经验;而准确的结果判定则依赖于准确的斑点计数和判定标准的正确运用。

(一)斑点计数

斑点计数通常有酶标斑点自动分析仪器法、显微镜计数法和放大镜计数法。

近年来国内外新上市的各类酶标斑点图像自动分析仪其性能不断提高,具有适用 PVDF 膜检测、斑点图像清晰并如同光学显微镜视野、检测速度快等优势,但价格昂贵。而缘于 T-SPOT. TB 检测过程受着色深浅、假斑点(杂物)等诸多因素影响,酶标斑点自动分析仪自动分析结果的准确性,特别是在介于临界值(cut off value, COV)上下阴性和阳性结果的判定上,是否需要人工协助目前尚未见报道,可能需要在今后的实践中逐步加以考证。

显微镜计数法在斑点放大 40 倍的条件下,其大小、形态,特别是酶标抗体捕获 T 细胞在原位分泌并释放细胞因子(IFN- γ)过程所形成的里密外疏形态清晰可见,具有简便、斑点鉴定准确的优势,特别是在介于 COV 上下阴性和阳性结果的判定上更加具有优势。

放大镜计数法不易识别杂物、吸头压痕等对斑点计数的干扰,强烈建议尽可能地避免使用。

笔者认为对基层单位而言,目前 T-SPOT. TB 试验斑点的确认和计数的最佳方法为显微镜计数法。

还需强调的是,酶标抗体捕获的细胞因子经显色、洗涤后而未经干燥处理的斑点在显微镜下观察其外形相对蓬松、色淡,有的不易确认,而干燥后的斑点则结构紧密、色浓,清晰易辨。可见干燥环节对于斑点的确认和计数很有必要,不可省略,省略此环节可能会导致某些结果的不准确。

(二)结果的判定

1. 正常结果的判定:通常正常结果空白对照孔没有或有很少斑点,而 PHA 对照孔斑点数超过 20 个^[10]。这一正常结果,可以认为空白孔本底分泌并释放 IFN- γ 的非特异性致敏 T 细胞很少,以至于不能被本方法检出,或细胞洗涤环节操作正确达到了排除非特异性干扰的目的;阳性对照孔细胞经 PHA 刺激有效,相当数量的 T 细胞具有反应性,试验有

效,结果可信。

2. “有反应性”与“无反应性”的判定:“有反应性”(阳性):①空白对照孔斑点数为 0~5 个时且(抗原 A 或抗原 B 孔斑点数)-(空白对照孔斑点数) ≥ 6 ;②空白对照孔斑点数为 6~10 个时且(抗原 A 或抗原 B 孔斑点数) $\geq 2 \times$ (空白对照孔斑点数)。“无反应性”(阴性):不符合上述标准且 PHA 对照孔正常时为“无反应性”。“有反应性”结果表明样本中存在针对结核分枝杆菌特异性的效应 T 细胞;“无反应性”结果表明样本中可能不存在针对结核分枝杆菌特异性的效应 T 细胞^[10]。

3. “不确定”结果的判定:空白孔斑点数超过 10 个,PHA 对照孔 < 20 个,被认为结果“不确定”^[10]。这一结果可能提示:①空白孔非特异性分泌并释放 IFN- γ 的 T 细胞较多,洗涤环节的操作没有达到去除非特异性 IFN- γ 的预期目的;②PHA 对照孔 T 细胞对 PHA 刺激无反应或反应较弱;③PHA 效价降低或存在质量问题。鉴于人们对通过洗涤可将大部分本底非特异性 IFN- γ 去除和极少数人群 T 细胞对 PHA 无反应的认识,对此应先行查找原因并重新复检。笔者在严格质量控制条件下集中检测疑似结核患者的 50 例标本中,其中空白对照孔斑点数为 0 个的 45 例(45/50),1~2 个的 4 例(4/50),4 个的 1 例(1/50)。PHA 对照孔斑点数 200 < 150 个的 2 例(2/50),布满整个反应孔的 48 例(48/50),其中不确定结果 0 例(0/50)。这一检测结果进一步佐证了上述人们的认知。

4. “灰区范围”:当空白对照孔斑点数为 0~5 个且(抗原 A 或抗原 B 孔斑点数)-(空白对照孔斑点数)等于 5~7 个时,此结果被认为在“灰区范围”,这主要是基于生物学和反应体系的原因^[12]。在这一“灰区范围”的结果,笔者建议在检验单中需注明“此结果在‘灰区范围’,建议重新复检”或预先在“检验单”参考值中标注“灰区范围”,并将“灰区范围”的含义加以简要说明,以便临床依据其他相关信息做出综合判断。

需要说明的是,虽然在卡介苗(BCG)和大部分环境分枝杆菌中都缺失 ESAT-6 和 CFP-10 抗原,但当感染堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*),苏尔加分枝杆菌(*M. szulgai*),海分枝杆菌(*M. marinum*)和戈登分枝杆菌(*M. goodii*)时,T-SPOT. TB 检测有可能出现“有反应性”的阳性结果^[9-10]。当怀疑上述细菌感染时有必要采用其他有效方法进行鉴别诊断。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control 2008: surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization, 2008.
- [2] Lalvani A, Pathan AA, McShane H, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(4): 824-828.
- [3] Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, et al. Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. AIDS, 2002, 16(17): 2285-2293.

- [4] 霍菲菲,张丽帆,刘晓清. 评价 γ 干扰素释放分析 T-SPOT. TB 在肺外结核病诊断中的敏感性. 中国医学科学院学报, 2009, 31(4):449-452.
- [5] 乐军,梁莉,李苏辉,等. 酶联免疫斑点试验快速诊断结核分枝杆菌感染的临床应用价值. 中华检验医学杂志, 2006, 29(11): 1005-1008.
- [6] 曾谊,冯泉,宋梅梅,等. 酶联免疫斑点试验在菌阴肺结核诊断中的价值. 中国防痨杂志, 2012, 34(2): 100-102.
- [7] 丛玉隆,冯仁丰,陈晓东. 临床实验室管理学. 北京:中国医药科技出版社, 2004:45-49.
- [8] Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, et al. Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T-SPOT. TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24(8):529-536.
- [9] Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, et al. Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. Eur Respir J, 2006, 28(1):31-34.
- [10] 上海复星长征医学科技有限公司. 结核感染 T 细胞检测(免疫斑点法)试剂盒说明书. 上海:上海复星长征医学科技有限公司, 2010.
- [11] 冯仁丰. 实用医学检验学. 上海:上海科学技术出版社, 1996: 79-80.
- [12] 朱忠勇,陈之航. 临床医学检验学. 上海:上海科学技术出版社, 1978:263-270.

(收稿日期:2013-04-21)

(本文编辑:王然 张晓进)

关于召开 2014 年结核病新诊断技术培训班的通知

为及时交流结核病科学研究工作动态,促进我国结核病防治和科研工作进展,中国防痨协会基础细菌免疫专业委员会联合《中国防痨杂志》期刊社定于 2014 年 6 月 27 日至 7 月 2 日在陕西省延安市召开 2014 年结核病新诊断技术培训班。

本次大会将就当前国家结核病防治工作中的难题,如患者发现、早期诊断、新诊断技术筛选评估、结核病的流行传播规律等进行探讨。内容涉及结核病基础研究、免疫学研究进展、结核病分子流行病学、结核病新诊断技术、实验室生物安全及个人防护、菌种保藏及运输、分枝杆菌的实验室检测等。培训班讲座初步安排如下:(1)赵国屏:结核分枝杆菌基因组研究进展;(2)程京:转化医学与结核病防治;(3)金奇:结核在科研重大专项中的问题;(4)马玟:结核临床中的问题和难题;(5)赵顺英:儿童结核病诊断及治疗;(6)张文宏:结核感染、诊断和治疗;(7)张海青:病理学在结核病诊断中的应用;(8)鲁辛辛:临床实验室重要问题;(9)胡继红:临床实验室质量控制;(10)吴雪琼:结核分枝杆菌疫苗研究进展;(11)赵雁林:耐多药结核分枝杆菌进化与传播;(12)胡忠义:噬菌体展示技术在结核病研究中的应用。

参会者可获国家级继续医学教育学分证书。请各有关单位组织人员踊跃参加。具体事宜如下:

1. 会议时间:2014 年 6 月 27 日至 7 月 2 日,6 月 27 日为报到日,7 月 2 日为撤离日。
2. 会议地点:陕西省延安市银海国际大酒店。
3. 会务费:600 元(含资料费)。会议将统一安排食宿,食宿及交通费自理。
4. 交通:本次会议不设接送站,请自行乘出租车前往会议酒店。(1)机场:乘出租车 40 元左右。(2)火车站:乘出租车 20 元左右。
5. 参会代表请将回执通过 Email 或传真于 6 月 15 日以前报中国防痨协会基础细菌免疫专业委员会秘书处。联系人:逢宇:010-58900779;13810098209;王玉峰:010-58900778;15201266588。传真:010-58900778。Email: pangyu@chinatb.org; yufeng711@126.com。

中国防痨协会基础细菌免疫专业委员会

《中国防痨杂志》期刊社