

胃癌的增殖与侵袭是一个多步骤、多因素相互作用的复杂过程,具体的机制尚不清楚,明确胃癌的转移与侵袭机制是当前研究领域的热点。基因异常和环境因素对胃癌的影响已经被广泛研究,但是疾病进展过程中所包含的分子机制并不明确。大量 miRNA 作为原癌基因或抑癌基因参与了肿瘤的恶性发展进程^[13]。本研究中多因素 Logistic 回归分析显示,胃癌患者的临床分期、组织分化程度、远端转移、lncRNA MALAT1 表达水平均为影响患者预后的主要因素($P<0.05$)。

综上所述,胃癌的发生伴随 lncRNA MALAT1 的高表达,其与患者的临床特征明显相关,也是影响患者预后的重要因素。

参考文献

[1] 曹季军,王金湖,申娟娟,等. lncRNA CCAT2 在胃癌患者血清中的表达及其临床诊断意义[J]. 检验医学,2019,34(9):775-779.

[2] 徐瀚斌,章由贤,刘放,等. 胃癌组织 lncRNA MEG3, GAS5 表达变化及其与患者临床病理特征和预后的关系[J]. 山东医药,2019,59(10):6-9.

[3] 李理,潘兆军,梁继珍,等. 胃癌组织中 lncRNA POU6F2-AS2 的表达及意义[J]. 山东医药,2019,59(28):17-20.

[4] 吴谢慧,赖铭裕,姜丹,等. 长链非编码 RNA-HOTAIR 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖凋亡的影响及可能机制[J]. 实用医学杂志,2019,35(11):1763-1768.

[5] 李歆,冯金鑫,杨素冰,等. 长链非编码 RNA RP11-356I2.

2 对胃癌的调控作用研究[J]. 实用医学杂志,2019,35(16):2522-2526.

[6] LIU Z, LIU J, WEI Y, et al. lncRNA MALAT1 prevents the protective effects of miR-125b-5p against acute myocardial infarction through positive regulation of NLRC5[J]. Exp Ther Med,2020,19(2):990-998.

[7] 杜娟,陈亚妮,史海燕,等. 长链非编码 RNA LINC00519 在胃癌中的表达及其临床意义[J]. 山西医科大学学报,2019,50(4):484-488.

[8] 闫国林,李仕青. 表观遗传学调控在胃癌中的研究进展[J]. 浙江临床医学,2019,21(3):429-431.

[9] 刘谦,夏兴洲,李金丽,等. 胃癌患者癌组织及血清中 lncRNA EXOC7 的表达及其临床意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2019,28(10):1117-1121.

[10] 唐晶,柯东,杜彩素,等. 长链非编码 RNA ZEB1-AS1 上调肿瘤细胞 SGC-7901 和 NCI-N87 受体酪氨酸激酶 c-MET 蛋白表达水平[J]. 军事医学,2019,43(1):25-29.

[11] 黄锋,贾浩源,姚永良,等. 差异表达的 miR-20a 对胃癌细胞恶性转化的影响及其机制研究[J]. 海南医学,2019,30(3):276-280.

[12] CARLEVARO-FITA J, LANZÓS A, FEUERBACH L, et al. Cancer lncRNA census reveals evidence for deep functional conservation of long noncoding RNAs in tumorigenesis[J]. Commun Biol,2020,3(1):56-90.

[13] 周原世,高泽玮,黄荣菊,等. 恶性肿瘤发生发展中小核仁 RNA 宿主基因 15 的作用及机制[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2019,33(10):1029-1032.

(收稿日期:2020-02-20 修回日期:2020-08-22)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.04.026

两种结核感染 T 细胞检测试剂盒性能评估

潘建华,张玲[△],李艳红,周锐雄,余俊鹏,杨锦鸿

广州金域医学检验中心血液室/广州医科大学金域检验学院,广东广州 510330

摘要:目的 评估外周血结核分枝杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)两种试剂盒的检测性能。方法 以英国 Oxford Immunotec 公司的 T-SPOT.TB 产品为参比试剂,以北京同生时代生物技术有限公司生产的 TS-SPOT.TB 产品为考核试剂。用两种试剂盒同时检测 458 份血液标本,其中临床标本 408 份来自金域集团 5 家连锁检验中心,体检标本 50 份来自金域体检中心,评估考核试剂与参比试剂的一致性。结果 两种试剂的检测结果总一致率为 98.03%($Kappa=0.96$),其中,广州金域检验中心一致率为 96.43%($Kappa=0.93$);杭州金域检验中心一致率为 97.73%($Kappa=0.95$);福州金域检验中心一致率为 98.44%($Kappa=0.97$);成都金域检验中心一致率为 98.75%($Kappa=0.97$);沈阳金域检验中心一致率为 100.00%($Kappa=1.00$);金域体检中心两种试剂检测结果一致率达 98.00%。结论 国产考核试剂与进口参比试剂检测性能相当,国产试剂成本相对较低,对基层医院广泛开展结核病筛查及预防有较好的应用价值。

关键词:结核感染 T 细胞斑点试验; 检测性能; 一致率

中图法分类号:R446.5 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2021)04-0516-03

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)感染导致的一种慢性传染病。肺外结核感染临床表现较为隐匿,症状不典型,容易导致误诊、漏诊^[1]。常规的 MTB 培养需要时间较长,培养条件要求较高,而且易受到标本

[△] 通信作者,E-mail:zhangling_75@126.com。
本文引用格式:潘建华,张玲,李艳红,等. 两种结核感染 T 细胞检测试剂盒性能评估[J]. 检验医学与临床,2021,18(4):516-518.

质量和 MTB 数量的影响,阳性率仅为 30%,痰涂片检出率也相对较低^[2]。近年来,MTB 感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)越来越受到关注,其利用酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测是否存在 MTB 感染 T 淋巴细胞后分泌的特异性细胞因子干扰素- γ (IFN- γ)来判断有无 MTB 感染^[3]。多项研究表明,T-SPOT. TB 在诊断 MTB 感染方面具有灵敏度高、特异性强的特点,目前已在临床上广泛应用^[4-8],而目前市场推广较为广泛的进口试剂由于价格昂贵,不能在临床上普及使用,因此,选择一种经济、快速、准确地诊断 MTB 感染的检测方法对于结核病的防治至关重要。本研究通过多家实验室验证评估国产与进口同类 T-SPOT. TB 产品的检测性能,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 来自广州金域(112 份)、杭州金域(88 份)、福州金域(64 份)、成都金域(80 份)、沈阳金域(64 份)检验中心的临床标本,共 408 份,来源患者中男 215 例,女 193 例;年龄 2~83 岁,中位年龄 47 岁。金域体检中心 50 份 T-SPOT. TB 检测体检标本,体检者中男 25 例,女 25 例;年龄 25~48 岁,中位年龄 35 岁;所有体检人员 HIV 抗体检测均为阴性。

1.2 仪器与试剂 参比试剂盒由英国 Oxford Immunotec 公司提供,考核试剂由北京同生时代生物技术有限公司提供。使用仪器包括安徽嘉文仪器装备有限公司生产的 JW-1050R 低速冷冻离心机、日本 Panasonic 生产的 CO₂ 培养箱,济南鑫贝西生物技术有限公司生产的 BIOBASE II 级生物安全柜,美国 CTL 公司生产的酶联免疫荧光斑点分析仪。淋巴细胞分离液、RPMI-1640 培养基分别由上海复星医药科技发展有限公司和北京同生时代生物技术有限公司提供。

1.3 方法 对 458 份标本分别使用参比试剂(进口)和考核试剂(国产)进行 ELISPOT,提取外周血单个核细胞刺激培养进行斑点计数判断结果,对两种试剂检测结果进行 *Kappa* 检验,以 *Kappa* 值 ≥ 0.75 为两者一致性较好。

1.3.1 标本采集 采血量:肝素抗凝全血,2 岁以下儿童 2~3 mL,其他年龄受试者 4~6 mL,免疫力低下或白细胞计数降低的受试者 6~8 mL。标本存储:标本室温(15~25 ℃)保存及运输,不得冷冻或冷藏,建议 24 h 内送至实验室,室温保存不应超过 32 h。

1.3.2 检测方法 所有操作均按照试剂盒说明书进行,参比试剂采用 ELISPOT 对早期分泌抗原靶 6 000(ESAT-6)和培养滤液蛋白 10 000(CFP-10)有反应的 T 细胞进行斑点计数;考核试剂采用 ELISPOT 对复合抗原 ESAT-6/CFP-10/Esx-1 底物蛋白 Rv3615c(Rv3615c)有反应的 T 细胞进行斑点计数。

1.4 判断标准

1.4.1 参比试剂结果判断 参比试剂检测结果包括

阴性对照孔和阳性对照孔、抗原 A 和抗原 B 结果。(1)试验有效的标准:阴性对照孔内斑点计数 <10 个,且阳性对照孔内斑点计数 >20 个。(2)阳性结果判断标准:①阴性对照孔斑点计数 <6 个,且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点计数—阴性对照孔斑点计数的结果 >6 个;②阴性对照孔斑点计数 >6 个,且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点计数 >2 倍阴性对照孔斑点计数。满足阳性结果判断标准任意一条即为阳性,否则为阴性。

1.4.2 考核试剂结果判断 考核试剂结果包括阴性对照孔、检测孔、阳性对照孔结果。当阴性对照孔斑点计数为 0~5 个时,考核试剂结果判断方法见表 1。

表 1 考核试剂结果判断		
P	T-N	结果判定
≥ 20 个	≥ 8 个	阳性
	< 8 个	阴性
< 20 个	≥ 8 个	阳性
	< 8 个	不确定

注:P 为阳性对照孔斑点计数;T 为检测孔斑点计数;N 为阴性对照孔斑点计数。表中为 N 为 0~5 个时的考核试剂结果判断方法。当 $P\geq 20$ 个,T-N=5、6、7 个时,建议判定为阴性结果,并结合临床诊断及其他检测结果进行综合判断,必要时可进行复查。

1.5 统计学处理 两种试剂检测的数据采用 *Kappa* 一致性检验分析。

2 结 果

2.1 考核试剂与参比试剂对临床标本的检测结果一致性 408 份临床标本中,400 份标本两种试剂检测结果一致,其中有 8 份标本两种试剂检测结果不一致,考核试剂检测为阳性,参比试剂检测为阴性,两种试剂的检测结果总一致率为 98.04% (*Kappa* = 0.96)。广州金域检验中心一致率为 96.43% (*Kappa* = 0.93);杭州金域检验中心一致率为 97.73% (*Kappa* = 0.95);福州金域检验中心一致率为 98.44% (*Kappa* = 0.97);成都金域检验中心一致率为 98.75% (*Kappa* = 0.97);沈阳金域检验中心一致率为 100.00% (*Kappa* = 1.00)。见表 2。

2.2 考核试剂与参比试剂对体检标本的检测结果一致性 50 份体检标本中,49 份标本两种试剂检测结果均与临床诊断符合,1 份标本考核试剂检测结果为阳性(斑点计数为 5 个),参比试剂为阴性,两种检测试剂一致率为 98.00%(49/50)。见表 2。

表 2 两种试剂检测结果比较						
项目	<i>n</i>	参比试剂		考核试剂		一致率 <i>Kappa</i> (%)
		阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	
		(<i>n</i>)	(<i>n</i>)	(<i>n</i>)	(<i>n</i>)	
金域体检中心	50	50	0	49	1	— 98.00
广州金域检验中心	112	63	49	59	53	0.93 96.43
杭州金域检验中心	88	58	30	56	32	0.95 97.73

续表 2 两种试剂检测结果比较

项目	n	参比试剂		考核试剂		Kappa	一致率 (%)
		阴性数	阳性数	阴性数	阳性数		
		(n)	(n)	(n)	(n)		
福州金域检验中心	64	39	25	38	26	0.97	98.44
成都金域检验中心	80	49	31	48	32	0.97	98.75
沈阳金域检验中心	64	38	26	38	26	1.00	100.00
合计	458	297	161	288	170	0.96	98.03

注：一为无数据。

3 讨 论

病原学检查常作为诊断结核病的金标准,如痰涂片常用于肺结核的诊断,但其受制于痰液取样及痰中 MTB 数量的影响,故灵敏度较低,且无法诊断肺外结核及不咳痰结核病,使其应用受到一定的限制^[9]。MTB 感染者外周血中存在 MTB 特异的活化效应 T 细胞,这些 T 细胞在受到 ESAT-6 和 CFP-10 刺激后分泌细胞因子,其中包括 IFN-γ。临床常通过检测 IFN-γ 的量和 ELISPOT 提取外周血单个核细胞刺激培养进行斑点计数,从而推测体内是否存在对 MTB 反应的效应 T 细胞,进一步对 MTB 感染情况进行辅助诊断。本研究两种试剂均采用 ELISPOT 原理,并同时设有阴性和阳性对照评估试验可靠性。ELISPOT 应用于结核病诊断已近 20 年^[10-11],能够检测出 1/100 000~1/50 000 的外周血单个核细胞中经抗原刺激后释放细胞因子的细胞,现已成为最敏感的检测方法之一。

本研究结果显示,考核试剂的检测性能不仅与参比试剂的检测性能一致性较好,而且在 MTB 阳性检出率方面优势更为突出,文中有 8 份标本考核试剂检测为阳性,而参比试剂检测为阴性,其中有 6 份阳性标本来源患者临床诊断为肺部疾病或有结核症状和治疗史,有 2 份标本阳性待确诊,尚不能排除假阳性的可能,分析原因可能与各自试剂抗原组合有关,参比试剂是通过 ELISPOT 检测 MTB 特异性抗原 ESAT-6 和 CFP-10 刺激 T 淋巴细胞释放的 IFN-γ 进行检测,为单抗原判读结果,容易造成一定比例的漏检,而考核试剂是采用复合三抗原(ESAT-6/CFP-10/Rv3615c)刺激 T 淋巴细胞释放的 IFN-γ,增加了检测敏感性,MTB 引起的机体免疫反应是多个抗原共同起作用的结果,而考核试剂在基础抗原 ESAT-6、CFP-10 基础上,增加了 ESX-1 底物蛋白 Rv3615c 抗原。Rv3615c 是免疫原性较强的靶抗原,其基因表达依赖 MTB 基因组 RD1 区,包含了多个肽段的集合体,可被 MTB 感染者 T 细胞识别。采用抗原三合一技术,更能模拟人体内 MTB 引起的免疫反应,在巨噬

细胞的吞噬体内活跃表达,更接近体内的真实情况,所以,运用复合抗原 EAST-6/CFP-10/Rv3615c 筛查 MTB 可提高结核病患者和潜伏结核感染人群的检出率。

综上所述,金域集团 5 家连锁检验中心同时用考核试剂和参比试剂对 408 份临床标本进行验证,均获得较高的检出率,两种试剂检测结果有较高的一致性,检验性能尚未发现有本质区别,对 MTB 感染的辅助诊断均具有指导意义。

参考文献

[1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012,34(8):485-508.

[2] 中华人民共和国国务院办公厅.“十三五”全国结核病防治规划[J]. 中国实用乡村医生杂志,2017,24(5):1-5.

[3] 王立红,付秀华,张桂芝,等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核病诊断中的应用价值[J]. 中国防痨杂志,2013,35(12):992-996.

[4] PAN L,JIA H,LIU F,et al. Risk factors for false-negative T-SPOT. TB assay results in patients with pulmonary and extra-pulmonary TB[J]. J Infect,2015,70(4):367-380.

[5] FAN L,CHEN Z,HAO X H,et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis:a systematic review and meta-analysis[J]. FEMS Immunol Med Microbiol,2012,65(3):456-466.

[6] ZHONG L,ZHOU X L,LI J,et al. The T-SPOT. TB test for diagnosis of breast tuberculosis[J]. Lab Med,2015,46(1):14-19.

[7] PENG L,XIU C,ZHU L M,et al. Interferon-Gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis:a systematic review and meta-analysis[J]. Lung,2016,194(3):447-458.

[8] 石慧,崔丽英. 结核感染 T 细胞斑点试验诊断结核性胸膜炎的应用价值[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2015,8(2):51-54.

[9] 张玉平,丁显平,张丽媛,等. T-SPOT. TB、痰涂片和 TB-DNA 检测在肺结核诊断中的比较研究[J]. 成都医学院学报,2013,8(1):49-51.

[10] 林凯生,林健雄. 酶联免疫斑点技术对结核分枝杆菌感染的诊断价值[J]. 实用医技杂志,2018,25(2):176-178.

[11] 刘丽,刘晓民. 结核感染 T 细胞斑点试验的临床应用价值[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2015,8(3):110-111.

(收稿日期:2020-05-07 修回日期:2020-11-08)