

T细胞斑点检测结核感染 ---21世纪结核诊断解决方案

目前应对结核的方法

疫苗接种

- 卡介苗接种作用有限，在有些国家仍然使用。
- 新的结核疫苗迫切需求，但目前没有任何新的产品。
- 即使现有的研究均能得到最终的疫苗产品，要变成常规使用至少还需要20年。

活动性结核的诊断和治疗

- 鉴别活动性病理
- 诊断手段有限（皮试、涂片、培养、X光）
- 药物化疗
- 治疗至少需要6个月。
- 在发展中国家主要进行活动性结核病控制，使总体发病例数量不增加。

潜伏性结核的诊断和治疗

- 是发达国家进行结核控制的关键。
- 在结核感染者转为活动性结核病并传染其他人前发现患者。
- 对潜伏性结核患者的治疗更简单更有效。





如何才能真正的消除结核病？

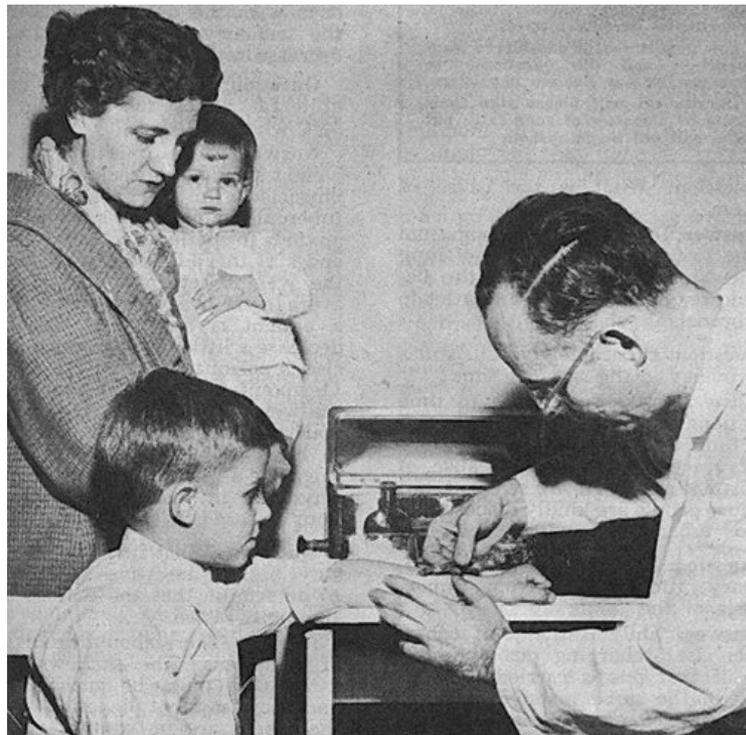
- 大量的潜伏性结核患者是新发结核病例的主要来源。
- 如果要降低活动性结核患病，必须先减少潜伏感染者数量。
- 潜伏感染的人群数量非常庞大。
- 潜伏患者人数的增长可能导致局部临床爆发。
- 因此，我们需要通过努力，鉴别并治疗这些潜伏期的结核患者。

- 8 百万新发病例/年
- 仅仅是冰山露出的1角



结核潜伏感染的诊断

- 潜伏感染的诊断仍然依赖于1百多年前发明的皮肤试验。
- **低特异性:** 与卡介苗接种和其他环境分枝杆菌感染有交叉。
- **低灵敏度:** 活动性结核病患者中灵敏度为75-90% (在播散性结核、HIV患者及免疫功能低下患者中较低，无潜伏性结核感染灵敏度数据)。
- 需要患者回访。
- 操作人员导致差异较大 (接种及读数)。
- 导致局部炎症与疤痕。



皮试使用60周年纪念照片.
(Canada 1957)



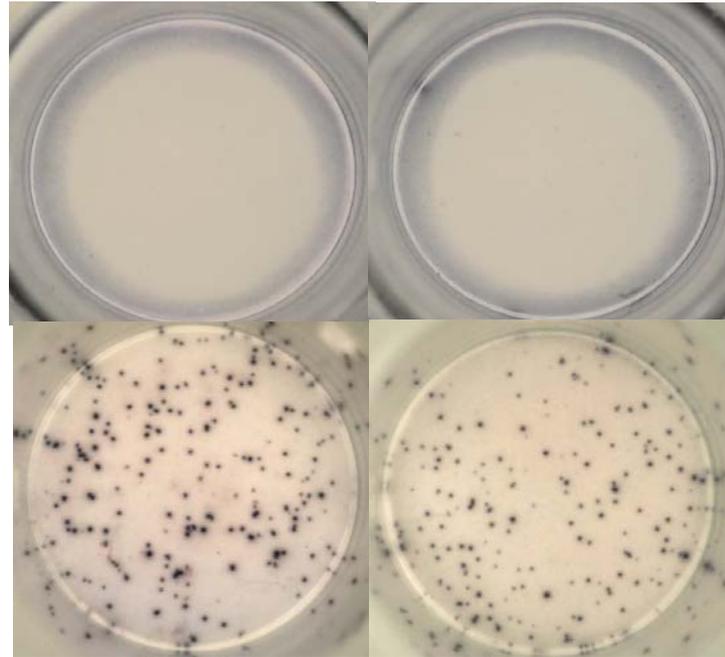
基于T淋巴细胞 检测结核病的原理

- *结核杆菌*: 胞内感染病原体, 感染后非常难治
- 机体对结核杆菌的体液免疫 (抗体) 较弱
- 结核杆菌感染激发机体产生较强的Th1细胞介导的细胞免疫应答
- 因此, 结核杆菌特异的T淋巴细胞可以作为结核感染的精确检测指标。

快速T细胞计数技术

体外酶联免疫斑点技术 **ELISPOT (T-SPOT.TB^{*})**

- 在单细胞水平检测细胞因子分泌
- 每一个斑点代表一个与相应抗原反应的单个细胞
- 快速 (体外试验)
 - 培养过夜
 - 检测效益T 细胞
 - 无放射性

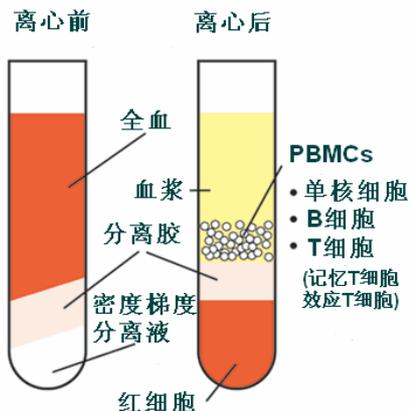


阴性结果

阳性结果

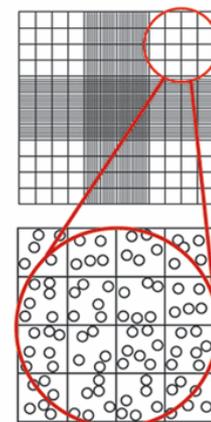
第一步

合适的采血管采集外周抗凝血，密度梯度离心分离外周血单个核细胞（PBMC）



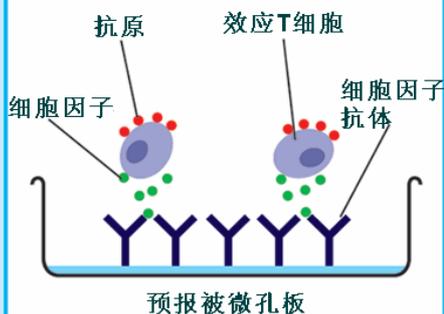
第二步

外周单个核细胞洗涤和计数并制备工作浓度细胞悬液



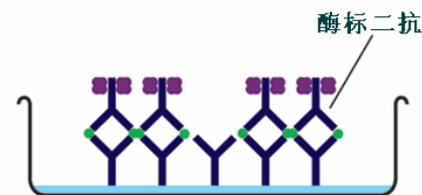
第三步

将细胞悬液和抗原加入微孔培养板，37℃，5% CO₂ 培养过夜

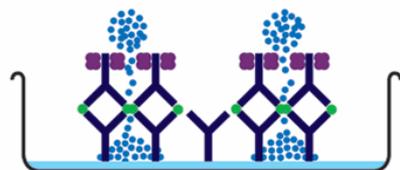


第四步

洗涤微孔板并加入酶标抗体



洗涤微孔板，并加入底物反应液



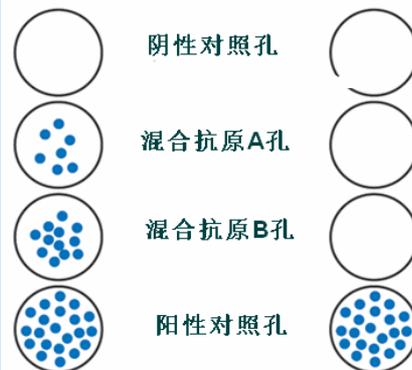
第六步

斑点计数

1个斑点=1个结核特异效应T细胞

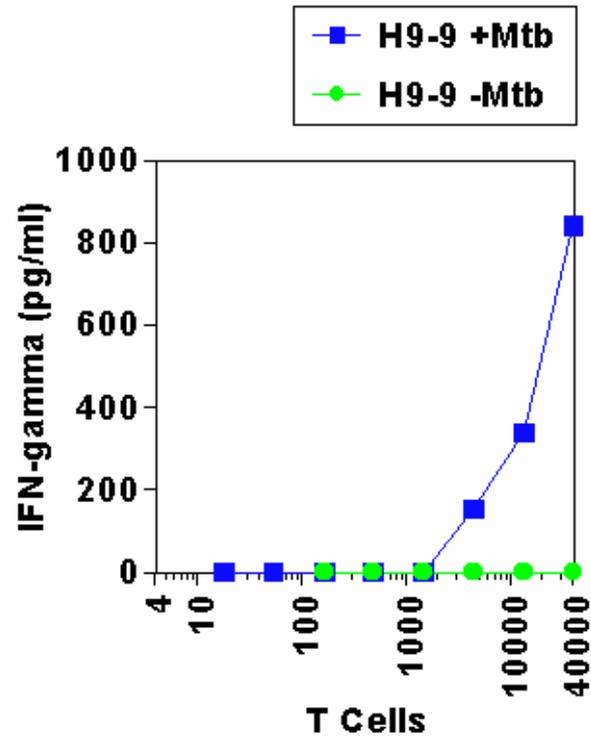
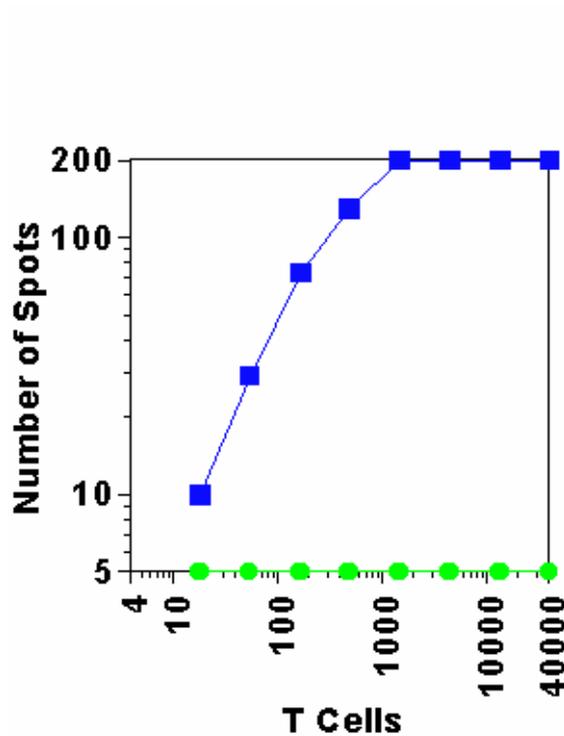
阳性结果

阴性结果

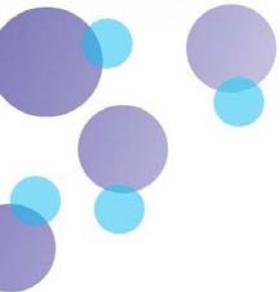


ELISPOT是直接检测血液中抗原特异T淋巴细胞的最灵敏方法

- ELISPOT可以检出数个有反应的T细胞
- 而 ELISA 至少需要 4,000有反应的 T 细胞才能检测



使用T细胞克隆进行ELISPOT和ELISA灵敏度比较，
David Lewinsohn, Oregon Health and Science University, Portland.



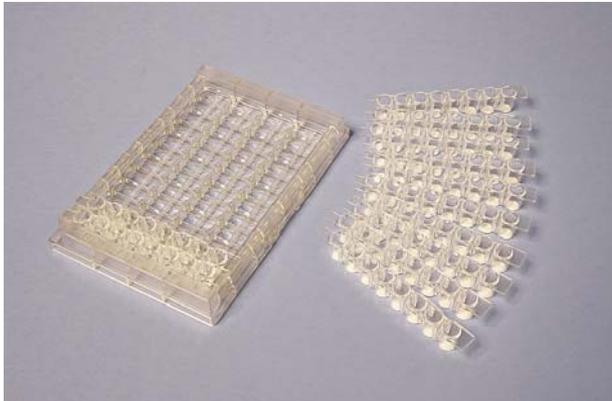
结核感染T细胞斑点检测试剂

---简便.可信.准确





T细胞斑点检测试剂盒





T细胞斑点检测试剂盒

简便

- 已知最敏感的T细胞检测技术
- 最新的科技，操作简单
- 血液检查，无需患者回访

可信

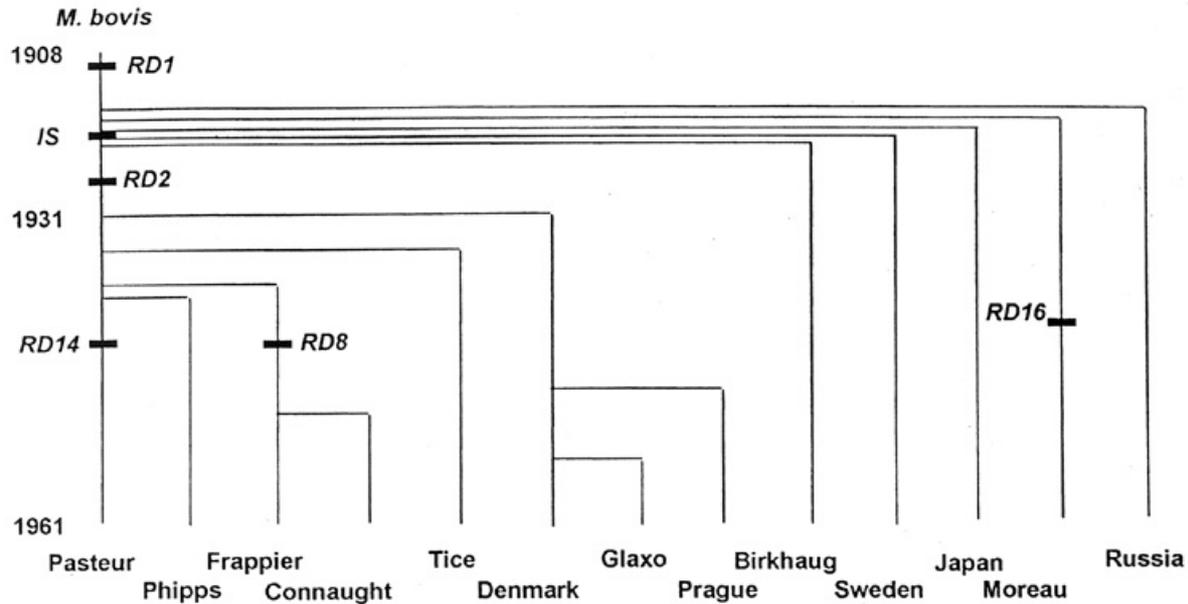
- 应对各种不同免疫功能患者，均可以产生高质量结果
- 检测结果基本不受免疫抑制影响
- 非常低的灰区结果（需要重复试验患者）

准确

- 已知全球最精确的结核检测技术
- 不受卡介苗接种影响
- 在已知患者试验中的高灵敏度和高特异性



T细胞斑点试验的高特异性



- 试剂盒中采用的两个抗原 (ESAT-6 & CFP 10) 均来自结核分枝杆菌基因组 RD1 区域
- 所有的卡介苗均缺失RD1 区基因
- 因此，结核感染T细胞斑点试剂盒不会受卡介苗接种影响
- 大多数环境分枝杆菌也缺失RD1区基因（仅结核分枝杆菌复合群存在RD1区）



T细胞斑点试验的高灵敏度

- **T-SPOT.TB 检测单个反应细胞**
 - 可以检测样品中每一个反应的T细胞
 - 即使在免疫功能低下的患者，只要单个的T淋巴细胞有反应，也同样可以被检出
- **T-SPOT.TB 检测所有类型的T细胞亚型：**
 - CD4 和 CD8 T细胞均被检测
 - 即使HIV患者中CD4 T 细胞被清除，只要CD8细胞有针对抗原的反应，也同样被检出

高灵敏度的技术结合高特异性的抗原，确保了T-SPOT.TB试剂盒的优异表现



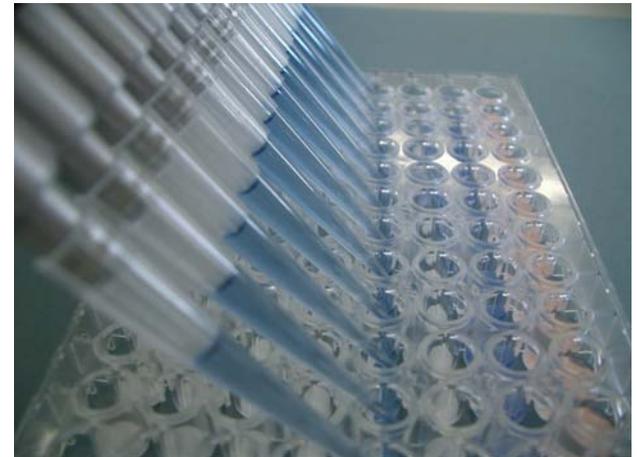
实验操作过程



第一步：细胞的制备

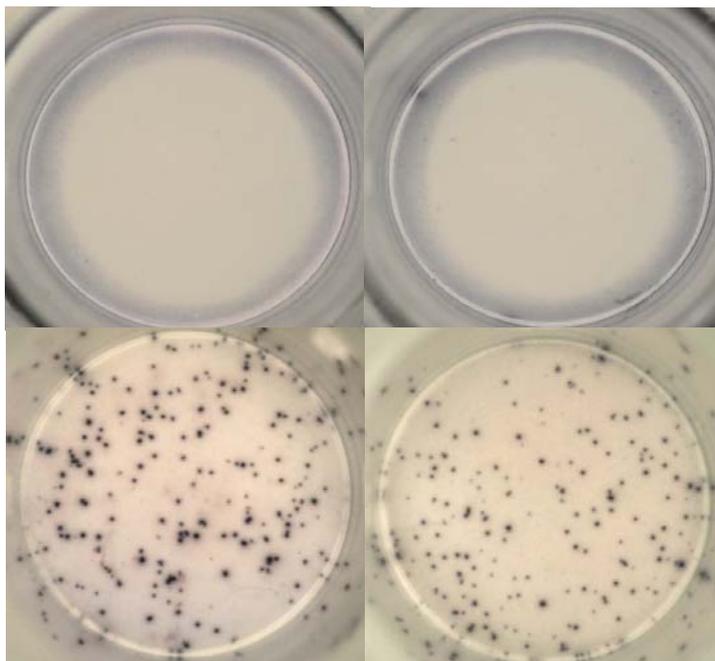


- 使用BD公司 Vacutainer CPT™ 进行血液采集
- 试管离心
- 分离外周单个核细胞层
- 细胞洗涤和计数
- 在96孔培养板内加入细胞
- 在培养板内分别加入抗原及对照
- 培养过夜



第二步 - 斑点形成

- 洗涤培养板
- 加入检测试剂孵育**60**分钟
- 洗涤培养板
- 加入底物液，孵育**7**分钟
- 培养板洗涤并干燥



阴性

阳性

第三步：斑点计数

- 可以使用放大镜或显微镜进行斑点计数
- 也可使用自动ELISPOT 计数仪



View Results: [Close] [Print] [Help]

SELECT SAMPLE:

1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24

E11 - H11

Patient ID: Result: **REACTIVE**

Assay: T-SPOT.TB Sample: 22 (E11 - H11)
Processing Date: Friday, January 14, 2005 Plate Layout: A B + - - B A
Plate Name: Plate 96 Operator: OI

POSITIVE	NEGATIVE	PANEL B	PANEL A
Valid Spot Count 94	Valid Spot Count 0	Reactive Spot Count 32	Not Reactive Spot Count 1