

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.29.010
文章编号: 1005-8982 (2018) 29-0053-05

新进展研究·论著

结核感染 T 细胞斑点试验在结核性浆膜炎中的诊断价值研究*

傅满姣, 吴佳玲, 贝承丽, 翟安, 杨芬, 王慧, 曹士鹏, 叶江英

(湖南省长沙市中心医院, 湖南 长沙 410004)

摘要:目的 探讨浆膜腔积液结核感染 T 细胞斑点试验 (T-SPOT.TB) 检测在结核性浆膜炎诊断中的价值。**方法** 选取 2014 年 8 月-2016 年 3 月于湖南省长沙市中心医院住院的 152 例可疑结核性浆膜炎患者, 按最终诊断分为结核组和非结核组, 两组行浆膜腔积液的腺苷脱氨酶 (ADA)、结核分枝杆菌培养、T-SPOT.TB 及结核杆菌脱氧核糖核酸检测 (TB-DNA), 比较 4 种方法在结核性浆膜炎诊断中的敏感性、特异性、阳性预测值及阴性预测值。**结果** 患者 T-SPOT.TB、ADA、TB-DNA 及结核分枝杆菌培养的敏感性分别为 88.2%、45.2%、9.8% 和 18.6%, 特异性分别为 86.0%、80.0%、98.0% 和 100.0%, 阳性预测值分别为 92.8%、82.1%、90.9% 和 100.0%, 阴性预测值分别为 78.2%、41.7%、34.8% 和 37.6%。T-SPOT.TB 诊断结核性胸膜炎、结核性腹膜炎及结核性心包炎的敏感性比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), T-SPOT.TB 与 ADA、TB-DNA、结核分枝杆菌培养的敏感性和特异性比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), T-SPOT.TB 检测 ROC 曲线面积为 0.893 (95%CI: 0.834, 0.952)。**结论** 浆膜腔积液 T-SPOT.TB 检测比 ADA、TB-DNA、结核分枝杆菌培养更适用于诊断结核性浆膜炎。

关键词: 结核感染 T 细胞斑点试验; 结核性浆膜炎; 腺苷脱氨酶; 结核分枝杆菌 DNA; 结核分枝杆菌培养

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

Value of T-SPOT.TB in diagnosis of tuberculous serositis*

Man-jiao Fu, Jia-ling Wu, Cheng-li Bei, An Zhai, Fen Yang, Hui Wang, Shi-peng Cao, Jiang-ying Ye
(Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: Objective To investigate the value of T-SPOT.TB detection in clinical diagnosis of tuberculous serositis. **Methods** A total of 152 patients of suspected tuberculous serositis in our hospital from August 2014 to March 2016 were recruited in the present study. They were divided into TB group (102 patients) and non-TB group (50 patients) according to the final diagnosis. Adenosine deaminase (ADA), *Mycobacterium tuberculosis* DNA (TB-DNA) and T-SPOT.TB of the effusion were detected, and *Mycobacterium tuberculosis* (TB) culture was made. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of the 4 methods for the diagnosis of tuberculous serositis were compared in the two groups. **Results** Regarding the four methods of T-SPOT.TB, ADA, TB-DNA and TB culture, the sensitivity was 88.2%, 45.2%, 9.8% and 18.6% respectively, the specificity was 86.0%, 80.0%, 98.0% and 100.0% respectively, the positive predictive value was 92.8%, 82.1%, 90.9% and 100.0% respectively, and the negative predictive value was 78.2%, 41.7%, 34.8% and 37.6% respectively. The sensitivity of T-SPOT.TB was different in the diagnosis of tuberculous pleurisy, tuberculous peritonitis and tuberculous pericarditis ($P < 0.05$); when the sensitivity and specificity of T-SPOT.TB were compared with those of ADA, TB-DNA and TB culture, the differences were all statistically significant ($P < 0.05$), the area under ROC curve of T-SPOT.TB test was

收稿日期: 2018-05-11

* 基金项目: 国家卫生和计划生育委员会传染病科技重大专项 (No: 2013ZX10005004)

0.893. **Conclusions** T-SPOT.TB may be more applicable for diagnosis of tuberculous serositis than ADA, TB-DNA and TB culture.

Keywords: T-SPOT.TB; tuberculous serositis; adenosine deaminase; *Mycobacterium tuberculosis* DNA; *Mycobacterium tuberculosis* culture

结核性浆膜炎是最常见的肺外结核,目前结核性浆膜炎诊断的金标准是结核杆菌培养阳性、组织病理活检证实为结核干酪样坏死^[1-2]。但结核杆菌培养耗时且阳性率低,而活检是有创检查,部分患者无法耐受。而结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test, TST)、浆膜腔积液常规生化、结核杆菌脱氧核糖核酸(tuberculosis deoxyribonucleic acid, TB-DNA)检测等常规临床检测方法又存在敏感性和特异性低的问题,因此急需一项简便耗时短、敏感性及特异性均高的结核性浆膜炎诊断方法。近年来,外周血 γ -干扰素释放试验(interferon-gamma release assays, IGRAs)已成为诊断结核感染的常用方法,其诊断结核的特异性明显高于TST^[3]。有研究显示,来自结核感染部位的体液样本,其中单核细胞数量高于外周血单核细胞数量^[4-5]。因此笔者推测浆膜腔积液结核感染T细胞斑点试验(tuberculosis infection T cell spot test, T-SPOT.TB)检测可以大大提高结核性浆膜炎的早期诊断率。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2014年8月-2016年3月湖南省长沙市中心医院住院收治的结核性浆膜腔积液患者102例作为结核组。其中,男性69例,女性33例;年龄18~75岁;结核性胸膜炎54例,结核性腹膜炎28例,结核性心包炎20例;92例有发热;患者结核确诊41例,临床诊断61例;经抗结核治疗96例明显好转,4例放弃治疗,1例合并重症肺炎并放弃治疗,2例合并肾衰,2例结核性心包炎,另有1例合并全身多器官结核死亡。纳入标准:①患者病史采集、体格检查、胸部影像学检查(胸部CT、X射线)、TST、浆膜腔积液常规检查、浆膜腔积液生化检查、T-SPOT.TB、TB-DNA、患者痰和浆膜腔积液抗酸涂片染色及结核分枝杆菌培养等资料齐全。②浆膜腔积液结核分枝杆菌抗酸染色涂片培养阳性,或有典型的组织病理学改变(干酪样坏死、上皮样肉芽肿改变等),且有临床症状、体格检查及影像学表现支持,定义为结核确诊患者;患者临床表现、体格检查、实验室检查(浆膜腔积液常规、生化)及胸部影像学表现符合结核性浆膜炎,

且诊断性抗结核治疗有效,定义为结核临床诊断患者。排除标准:患有HIV感染、严重营养不良、恶病质、麻疹及水痘。选取同期本院收治的非结核性浆膜腔积液患者50例作为非结核组。其中,男性35例,女性15例;年龄28~78岁;肿瘤转移至胸膜25例,脓胸5例,自发性腹膜炎3例,肿瘤转移至腹膜11例,心力衰竭致心包积液2例,肿瘤转移至心包4例,肿瘤患者逐渐恶化,心力衰竭患者好转。纳入标准:①患者病史采集、体格检查、胸部影像学检查(胸部CT、X射线)、TST、浆膜腔积液常规检查、胸膜腔积液生化检查、T-SPOT.TB、TB-DNA、患者痰和浆膜腔积液抗酸涂片染色及结核分枝杆菌培养等资料齐全;②痰、浆膜腔积液涂片抗酸染色、结核培养或组织病理学结果为阴性,无结核接触史及陈旧性结核病史,并可以明确诊断为其他疾病,针对原发疾病治疗有效果^[6]。排除标准:患有HIV感染、严重营养不良、恶病质、麻疹及水痘。两组患者的年龄、性别、激素及免疫抑制剂使用、既往结核病史及基础疾病比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

患者入院后取新鲜浆膜腔积液约50 ml,在浆膜腔积液标本采集后2 h内送本院检验实验室,在4 h内完成T-SPOT.TB、腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)、TB-DNA及结核杆菌培养检测。

1.2.1 T-SPOT.TB 本研究采用T-SPOT.TB试剂盒(英国Oxford Immunotec公司)。将浆膜腔积液患者的标本分离得到单个核细胞,并马上制备成细胞浓度为 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液。将相对应的细胞培养液作为阴性对照,取植物血凝素作为相应的阳性对照,采用结核杆菌特异性抗原-早期分泌抗原靶蛋白(6kD early secreting antigen target-6, ESAT-6)和培养滤液蛋白10(culture filtrate protein 10KD, CFP-10)作为刺激抗原。在检测板的每个孔内加入抗原和单个核细胞,将微孔板放在含5%二氧化碳 CO_2 的培养箱中培养18~20 h;48 h后洗板,并加入生物素标记的相应二抗,放置于2~8℃的环境中反应1 h,再次洗板并加入显色底物液,在室温下静置约7 min后用去离子水终止显色反应。上机检测斑点形成细胞数。ESAT-6

和 CFP-10 的斑点数任一项 >50SFCs/10⁶SEMC 定义为阳性。

1.2.2 浆膜腔积液上清 ADA 的检测 采用加入 EDTA 抗凝剂的玻璃瓶收集浆膜腔积液 10 ml, 3 000 r/min 离心 5 min, 取浆膜腔积液上清, 并用用酶比法(宁波美康生物科技有限公司提供试剂盒)检测上清液中 ADA 的相应含量, ADA>45 u/L 定义为阳性。

1.2.3 TB-DNA 检测 采用结核杆菌特异性引物、特异性荧光探针, 混合 PCR 的反应液、Taq 酶、核苷酸单体, 采用 PCR 体外扩增法(广州市中山大学达安基因有限公司提供试剂盒)检测结核杆菌 DNA。

1.2.4 结核分枝杆菌培养检测 采用液体培养基及 BACTEC-TB 960 法进行浆膜腔积液的分枝杆菌快速培养, 取 5 ml 浆膜腔积液于无菌试管中送检, 根据说明书进行操作。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计学软件, 计数资料以率(%)表示, 比较用 χ^2 检验; 绘制 ROC 曲线, 计算敏感性、特异性、Youden 指数、阳性预测值及阴性预测值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 浆膜腔积液 T-SPOT.TB 患者诊断结核性浆膜炎的 ROC 曲线

将 152 例浆膜腔积液 T-SPOT.TB 患者检测结果绘制成 ROC 曲线, 曲线下面积为 0.893(95%CI:0.834, 0.952), 浆膜腔积液中 T-SPOT.TB 的最佳诊断阈值(cutoff 值)为斑点数 108.5SFCs/10⁶SEMC (Youden 指数最高)。见图 1。

2.2 不同浆膜腔炎中 T-SPOT.TB 的敏感性比较

T-SPOT.TB 诊断结核性胸膜炎、结核性腹膜炎

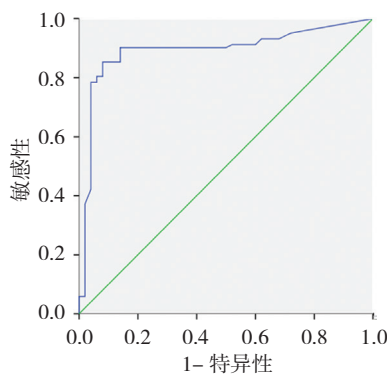


图 1 浆膜腔积液 T-SPOT.TB 诊断结核性浆膜炎的 ROC 曲线

及结核性心包炎的敏感性分别为 92.6%、89.3% 和 80.0%, 经 χ^2 检验, 差异无统计学意义 ($\chi^2=2.688$, $P=0.268$)。

2.3 各检测指标敏感性、特异性、Youden 指数、阳性及阴性预测值比较

T-SPOT.TB 分别与 ADA、TB-DNA、结核分枝杆菌培养的敏感性和特异性比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.867$ 、6.069 和 3.911, $P=0.027$ 、0.014 和 0.048)。T-SPOT.TB 的 Youden 指数高于 ADA、TB-DNA 及结核分枝杆菌。T-SPOT.TB 的阳性预测值高于 ADA 及 TB-DNA, 仅低于结核分枝杆菌培养。T-SPOT.TB 的阴性预测值高于 ADA、TB-DNA 及结核分枝杆菌。见附表和图 1 ~ 4。

附表 各检测指标敏感性、特异性、Youden 指数、阳性及阴性预测值比较

指标	敏感性 / %	特异性 / %	Youden 指数	阳性预测值	阴性预测值
T-SPOT.TB	88.2	86.0	74.2	92.8	78.2
ADA	45.2	80.0	25.2	82.1	41.7
TB-DNA	9.8	98.0	7.8	90.9	34.8
结核分枝杆菌培养	18.6	100	18.6	100.0	37.6

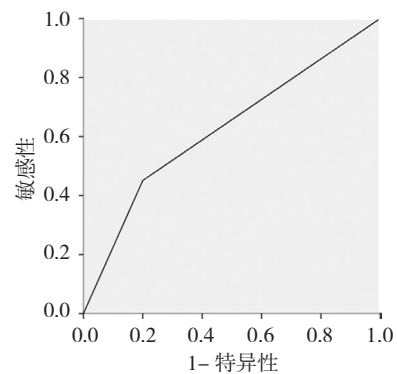


图 2 浆膜腔积液 ADA 诊断结核性浆膜炎的 ROC 曲线

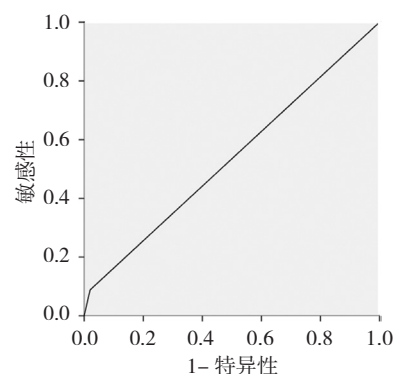


图 3 浆膜腔积液 TB-DNA 诊断结核性浆膜炎的 ROC 曲线

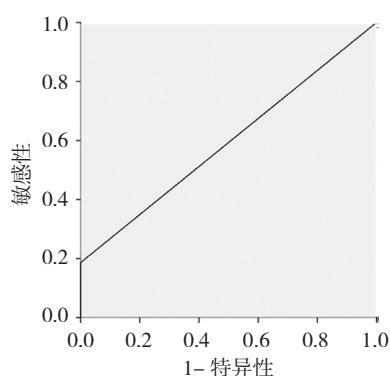


图 4 浆膜腔积液结核分枝杆菌培养诊断结核性浆膜腔炎的 ROC 曲线

3 讨论

浆膜腔积液在临床实际工作中多见, 病因有: 结核、恶性肿瘤原发和转移、非结核感染、肝硬化、肾病及心功能不全等, 结核性浆膜腔积液在我国较多见。结核性浆膜腔积液早期临床症状不典型, 难以根据临床表现、积液的常规生化早期诊断。T-SPOT.TB 检测中纳入结核分枝杆菌特异抗原, 即 ESAT-6 和 CFP-10, 由 RD1 区编码^[5-7]。该区只存在于结核分枝杆菌复合群和少数致病性非结核分枝杆菌基因组中, 用 ESAT-6 和 CFP-10 作为结核分枝杆菌感染的特异性 T 细胞刺激抗原, 通过酶联免疫斑点试验检测受试者体内是否存在结核效应 T 细胞, 从而判断受试者是否感染结核分枝杆菌。本研究中, 行浆膜腔积液 T-SPOT.TB 检测可以获得较高的敏感性、特异性、Youden 指数、阳性及阴性预测值。且本研究所获得的 T-SPOT.TB 敏感性值与之前报道大体一致^[8-12]。本研究中, 结核性胸膜炎的敏感性为 92.6%, 结核性腹膜炎的敏感性为 89.3%, 结核性心包炎的敏感性为 80.0%, T-SPOT.TB 诊断结核性胸膜炎敏感性高, 可能与结核性胸膜炎较其它浆膜炎多见有关。3 者的 TSPOT.TB 敏感性均 >80%, 提示浆膜腔的 TSPOT.TB 检测对诊断结核性胸膜炎、腹膜炎及心包炎均有一定临床价值。

本研究得出浆膜腔积液 T-SPOT.TB 的敏感性 88.2% 和特异性 86.0%, 与张丽帆等^[6]报道的浆膜腔积液 T-SPOT.TB 的灵敏度 91.9% 和特异性 87.1% 相似。本研究中浆膜腔积液的 ADA 敏感性低于 T-SPOT.TB, 敏感性仅为 45.2%, 说明 ADA 与 T-SPOT.TB 相比, 难以检测到结核性胸膜炎的发生。浆膜腔积液 TB-DNA 的敏感性在本研究中仅为 9.8%, 与万

荣等^[13]观察的 150 例结核性胸膜炎中的 TB-DNA 诊断敏感性 7.4% 相似。但 TRAJMAN 等^[14]研究发现: TB-DNA 诊断结核性胸膜炎的敏感性为 35% ~ 82%, 特异性为 85.4% ~ 100%, 高于本研究敏感性数值, 考虑与选择患者病情严重程度、肺结核是否接近胸膜有关。TB-DNA 特异性在本研究中为 98%, 与 TRAJMAN 等^[14]的研究结果相近。本研究中结核分枝杆菌培养敏感性为 18.6%, 特异性为 100%, 与陈希等^[15]所报道的 93 例胸腔积液的结核培养灵敏度 (14.6%) 和特异度 (100%) 相似。这充分说明, 浆膜腔积液的结核培养作为结核诊断的金标准, 具有相当高的特异性, 但是结核培养周期长、假阴性率高, 严重地制约了结核杆菌培养在临床上的应用。

本研究中 T-SPOT.TB 的阴性预测值高于其他预测指标, 提示 T-SPOT.TB 诊断结核性浆膜腔积液的假阴性率低, T-SPOT.TB 检测结果阴性表示罹患结核的可能性非常小, 对于排除结核性浆膜炎更有临床诊断价值。本研究中 T-SPOT.TB 检测出现 7 例假阳性, 其中肺癌转移患者 5 例, 卵巢癌转移患者 1 例, 乳腺癌转移患者 1 例, 这可能与肿瘤患者免疫力低下, 取浆膜腔积液样本时正处于结核潜伏感染期或者为陈旧性肺结核患者。在临床实际工作中, 曾出现痰涂片阳性, 但 T-SPOT.TB 检测阴性的情况, 这也可能与目前结核辅助筛查手段胸部 CT 难以发现微小的胸部结核病灶相关^[16]。因此 T-SPOT.TB 检测阳性, 必须要结合结核相关临床表现及相关辅助检查综合判断, 指导患者的诊疗。本研究也出现假阴性的情况, 原因可能与在采浆膜腔积液样本时, 虽有结核杆菌感染, 但体内的 T 细胞未致敏, 或者当患者合并 HIV 等免疫缺陷疾病时, 机体难以对结核杆菌产生应有的免疫应答, 因此当 T-SPOT.TB 检测结果阴性时, 也不能单凭这一结果否定结核的诊断, 而应当考虑患者的临床表现、其他辅助检查结果, 综合评判。NEMETH 等^[17]认为, 结核杆菌感染的部位具有隔室化的特点, 即机体免疫系统中大量 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞被募集到结核感染部位, 并且分泌大量的细胞因子从而发挥对结核杆菌的免疫应答。本研究中浆膜腔积液 T-SPOT.TB 检测阳性率较高, T 细胞敏感性高, 也支持该结论。随着医学生物技术的发展, T-SPOT.TB 检测技术样本已经不再局限于外周血标本, 胸水、腹水、纤维支气管镜下支气管肺泡灌洗液、痰液及心包穿刺液等已尝试用于结核检测。

目前, 有研究者尝试用结核性脑脊液进行 T-SPOT.TB 检测, 但是因脑脊液中 T 细胞数太少, 难以检测。目前胸水用于 T-SPOT.TB 检测的研究较为深入, 本研究发现 T-SPOT.TB 检测结核性胸腔积液具有较高的敏感性和特异性, 同时发现除了用于检测结核性胸膜炎, T-SPOT.TB 检测用于结核性腹膜炎、心包炎同样具有较高的敏感性、特异性、阳性和阴性预测值, 对早期诊断结核性胸腔积液有较高的临床诊断价值。

参 考 文 献:

- [1] SEISCENTO M, VARGAS F S, RUJULA M J, et al. Epidemiological aspects of pleural tuberculosis in the state of Sao Paulo, Brazil (1998-2005)[J]. *J Bras Pneumol*, 2009, 35: 548-554.
- [2] GOPI A, MADHAVAN S M, SHARMA S K, et al. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006[J]. *Chest*, 2007, 131: 880-888.
- [3] 陈雪林, 邢俊蓬, 马亮亮, 等. γ 干扰素释放试验新试剂的临床应用研究 [J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(5): 537-538.
- [4] 张贺秋, 赵雁林 主编. 现代结核病诊断技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社. 2013: 251.
- [5] ZHANG L, ZHANG Y, SHI X, et al. Utility of T-cell interferon- γ release assays for diagnosing tuberculous serositis: a prospective study in Beijing, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): DOI: 10.1371/journal.pone.0085030.
- [6] 张丽帆, 刘晓清. 胸腹水、脑脊液中结核分枝杆菌 RDI 基因编码抗原刺激后释放 γ 干扰素的特异 T 细胞检测 [J]. *中国医学科学院学报*, 2009, 31: 438-442.
- [7] WILKINSON K A, WILKINSON R J, PATHAN A, et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 40(1): 184-187.
- [8] 崔丹, 赵杰, 杨永辉, 等. γ 干扰素释放试验在结核性胸膜炎中的诊断价值 [J]. *北京医学*, 2013, 35(12): 996-998.
- [9] 郑春燕, 李海, 杨莉, 等. 酶联免疫斑点技术在快速诊断结核性胸膜炎中的应用 [J]. *广东医学*, 2013, 34(16): 2503-2506.
- [10] 宋巍, 朱可玉, 孙艳华, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核性疾病中的诊断价值分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(9): 1934-1935.
- [11] 刘晓清. γ -干扰素释放试验体液 (浆膜腔积液和脑脊液) 检测诊断结核病的临床应用 [J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(7): 728-731.
- [12] 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]. *中华肺部疾病杂志电子版*, 2015, 8(2): 51-54.
- [13] 万荣, 张明荣, 赖明红, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核性胸膜炎中的诊断价值 [J]. *昆明医科大学学报*, 2013 (9): 134-136.
- [14] TRAJMAN A, KAISERMANN C, LUIZ R R, et al. Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2007, 67(8): 877-884.
- [15] 陈希, 李晓轅, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核性胸膜炎诊断中的价值 [J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(1): 40-46.
- [16] 刘菲, 张霞, 李玲, 等. γ 干扰素释放试验检测胸腔积液对诊断结核性胸膜炎的初步探讨 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(5): 323-327.
- [17] NEMETH J, WINKLER H M, ZWICK R H, et al. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4⁺Tcells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis[J]. *J Intern Med*, 2009, 265: 163-168.

(李科 编辑)