

比较四种实验室辅助检查方法在肺结核诊断中的应用价值^{*}

王铁山, 齐墨词

(首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心, 北京 100050)

摘要:目的 评价结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT)、荧光 PCR、抗结核抗体试验、抗酸染色四种辅助检查方法对于肺结核诊断的应用价值。方法 回顾性分析 2012 年 1 月~2014 年 12 月期间 530 例同时进行上述四项检查的病例,以临床诊断为金标准,计算四种方法的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、Kappa 值、约登指数、阳性似然比、阴性似然比等指标,进行四种检测方法之间的配对 χ^2 检验。结果 T-SPOT 敏感度 95.90%,误诊率 14.33%,阴性预测值 97.29%,约登指数 0.82,均为最高,阴性似然比 0.05 为最低;PCR 漏诊率 87.18%为最高;抗结核抗体阳性似然比 6.48 为最低;抗酸染色特异度 99.70%,阳性预测值 98.90%,阳性似然比 153.83 均为最高。四种方法间两两比较差异均有统计学意义。结论 T-SPOT 和抗酸染色可作为重要的辅助检查,抗结核抗体具有高时效的特点,而 PCR 方法更适用于无菌部位体液的检查。

关键词:结核感染 T 淋巴细胞斑点试验;聚合酶链反应;抗结核抗体;抗酸染色;肺结核

中图分类号:R521;R446 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)01-134-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.01.039

A Comparative Study on Four Methods in the Diagnosis of Tuberculosis

WANG Tie-shan, QI Mo-ci (Clinical Laboratory Center,

Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the value of four methods in diagnosis of pulmonary tuberculosis, including T-SPOT, fluorescent PCR, anti-TB antibody test, and acid-fast staining. **Methods** Retrospective analysis of 530 cases between January 2012 and December 2014 who had taken four methods, and calculated the sensitivity specificity, positive predictive value, negative predictive value, Kappa value, Youden index, positive likelihood ratio, negative likelihood ratio, Paired χ^2 test. Consider clinical diagnosis as the gold standard. **Results** The sensitivity, negative predictive value, Youden index of T-SPOT were 95.90%, 97.29%, 0.82, respectively, and all of these were the highest. The negative likelihood ratio of T-SPOT was 0.05, which was the lowest. Misdiagnosis rate of PCR was 87.18%, which was the highest. Positive likelihood of anti-TB antibody test was the lowest, 6.48, while other indicators were no advantage. The specificity, positive predictive value and positive likelihood ratio of acid-fast staining were 99.70%, 98.90%, 153.83, respectively, and the three of these were highest. Pair-wise comparison between the four methods were significantly different. **Conclusion** The T-SPOT and acid-fast staining can be used as important methods, and the anti-TB antibody can provide result quickly, and PCR method is more suitable for examination of sterile body fluids.

Keywords: T-SPOT; PCR; anti-TB antibody; acid-fast staining; tuberculosis

近些年以来,随着全球结核病疫情的再度加重,我国结核病负担已在全球居于前列。控制结核病依赖于早期诊断和早期治疗,而诊断水平的落后将直接影响临床疗效和进一步的疫情控制。目前结核病确诊的主要依据仍然是传统的细菌学检查(包括培养和涂片染色镜检),因此发展和应用快速易行的检测方法极为重要也理应受到重视。纵观免疫学和分子生物学的发展,诊断方法近年来取得了长足的进步,并且已应用在结核病的诊断上。我科室针对结核患者检测分别开展了涂片抗酸染色、抗结核分枝杆菌抗体(TBAB)、荧光 PCR、结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT)等细菌学、免疫

学、分子生物学的诊断方法,现对上述几种方法对结核病的诊断能力做一研究,需要说明的是研究的结核病是肺部结核病,不包括肺外结核病。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2012 年 1 月~2014 年 12 月间送检到我科室进行上述四项检测的标本数据进行回顾性分析。纳入标准是同时送检上述四项检查的患者,标本类型的要求说明如下:抗酸染色可接受的标本类型为痰液、气管镜灌洗液、气管镜刷片,对于荧光 PCR 接受的标本类型为气管镜灌洗液、痰液, T-SPOT 要求绿帽采血管采集的新鲜全血,抗结核抗体要求红帽采血管分离的血清。排

* 作者简介:王铁山(1985—),男,硕士,医师,研究方向为细菌耐药性及感染性疾病诊断, Tel:010-63138577, E-mail:ironthree@163.com。

除标准为检验报告中备注弱阳性、可疑阳性、标本量不满足要求、采血时机错误者、不能明确诊断或者排除结核、已经进行了试验性抗结核治疗。最终有 530 例满足要求。

1.2 试剂 T-SPOT 试剂为结核感染 T 淋巴细胞斑点试验试剂盒(Oxford Immunotec limited, 英国);PCR 试剂为结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光, 中山大学达安基因股份有限公司);抗结核抗体试剂为结核分枝杆菌抗体(IgG)检测试剂盒(胶体金法, MP 生物医学亚太私人有限公司);抗酸染色试剂为抗酸染液(珠海贝索生物技术有限公司)。所有试剂操作均按照说明书进行。

1.3 方法和标准 诊断标准是根据世界卫生组织对结核(包括肺结核及肺外结核)、非结核病例的诊断标准 WS288-2008 进行分组,以临床诊断为金标准。结核病例:获得结核分枝杆菌细菌学证据或病理学证据、抗结核治疗后症状好转或临床诊断结核病后经抗结核治疗后症状好转。非结核病例:最终诊断排除结核病,经非抗结核方法治疗后主要症状基本消失。本实验中 530 例,其中临床诊断为结核患者为 195 例,非结核患者 335 例。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 15.0 进行统计分析,各项检测结果以阴性/阳性表示,以临床诊断为金标准,计算四种方法的敏感度、漏诊率、特异度、误诊率、阳性预测值、阴性预测值、Kappa 值、约登指数、阳性似然比、阴性似然比等,同时进行四种检测方法之间的配对 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各种方法的检测结果

2.1.1 T-SPOT 检测:530 例患者中检测阳性为 235 例,占 44.3%,检测阴性为 295 例,占 55.7%。

2.1.2 PCR 检测:530 例患者中检测阳性为 27 例,占 5.1%,检测阴性为 503 例,占 94.9%。

2.1.3 抗结核抗体检测:530 例患者中检测阳性为 105 例,占 19.8%,检测阴性为 425 例,占 80.2%。

2.1.4 抗酸染色检测:530 例患者中检测阳性为 91 例,占 17.2%,检测阴性为 439 例,占 82.8%。

2.2 各种方法的诊断价值,统计学指标及相关性分析 见表 1,表 2,表 3。

3 讨论 肺结核病是较为常见的传染病,对人体具有很大的危害,因此结核病的早发现早治疗便成为了结核病防控的主要目标。本研究对目前我院针对结核诊断开展的四项检测进行比较发现,四种方法间两两比较差异均有统计学意义($P<0.01$),对其各自特点论述如下。

表 1 四种方法检测与临床诊断结果比较

临床 诊断	TSPOT		PCR		抗结核抗体		抗酸染色	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	187	8	25	170	83	112	90	105
阴性	48	287	2	333	22	313	1	334
合计	235	295	27	503	105	425	91	439

表 2 四种方法的方法学指标

指 标	T-SPOT	PCR	抗结核抗体	抗酸染色
敏感度(%)	95.90	12.82	42.56	46.15
漏诊率(%)	4.10	87.18	57.44	53.85
特异度(%)	85.67	99.40	93.43	99.70
误诊率(%)	14.33	0.60	6.57	0.3
阳性预测值(%)	79.57	92.59	79.05	98.90
阴性预测值(%)	97.29	66.20	73.65	76.08
Kappa 值	0.79	0.15	0.44	0.52
约登指数	0.82	0.12	0.36	0.46
阳性似然比	6.69	21.37	6.48	153.83
阴性似然比	0.05	0.88	0.61	0.54

表 3 四种方法的相关性分析(χ^2 值)

项 目	T-SPOT	PCR	抗结核抗体	抗酸染色
T-SPOT	—	204.08	108.33	139.11
PCR	204.08	—	74.20	60.24
抗结核抗体	108.33	74.20	—	9.39*
抗酸染色	139.11	60.24	9.39*	—

注:* 抗结核抗体和抗酸染色方法比较,四格表中由于 b+c<40,选用了校正公式。表中均 $P<0.01$ 。

T-SPOT 是由 ELISPOT 发展而来,是以 RDI 编码的早期分泌抗原靶蛋白(early secreting antigen target-6, ESAT-6)和培养滤过蛋白-10(culture filtrating protei-10, CFP-10)作为特异性刺激原来刺激 T 淋巴细胞,具有比较强的 Th1 细胞免疫原性,应用酶联免疫斑点技术检测外周血中结核分枝杆菌特异性释放 γ -干扰素的 T 细胞^[1]。国内外多项研究结果表明,T-SPOT 诊断结核病具有较高的敏感度和特异度。这与我们统计的数据基本相符,而且其检验结果不受机体 CD4+T 细胞数影响,受试者免疫状态的影响较小^[2,3],并且制备卡介苗的菌株及绝大多数非结核分枝杆菌中均不存在该抗原,因此与卡介苗和绝大多数非结核分枝杆菌无交叉免疫反应^[4],具有操作简单、周期短、敏感度和特异度高等优点,因此有较高的临床应用价值。需要注意的是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. goodnae*)时,T-SPOT

检测可能出现假阳性结果。

在我们的统计中 T-SPOT 诊断结核病的综合敏感度为 95.90%，特异度为 85.67%，漏诊率 4.10%，约登指数 0.82，Kappa 值 0.79，其敏感度、约登指数、Kappa 值是几种方法中最高的，有助于结核病的准确筛选及诊断。与文献报道数据基本相符，尤其是特异度方面 (89.9%)^[7]。虽然 T-SPOT 检测对排除结核有重大意义，在几种方法漏诊率为最低，阴性预测值为 97.29% 最高，阴性似然比 0.05 为最低，即便 T-SPOT 检测阴性也不能完全排除结核分枝杆菌感染的存在，本研究中有 4.1% (8/195) 的 T-SPOT 检测阴性患者诊断为结核病例，主要依赖于临床症状和其他实验室检查及抗结核治疗后病情的变化。文献报道抗结核治疗可影响 T-SPOT 的检测结果。结核特异性效应 T 细胞在体内存活期很短，一般在病原体消灭后即消失^[5]。此外，有研究对未接受治疗的结核分枝杆菌潜伏感染者在不同时间进行 γ -干扰素 ELISPOT 检测，发现 ESAT-6 和 CFP-10 特异性斑点数自然下降^[6]。在临床上是否有此现象，还需要更全面的临床研究加以证实。由此可见，T-SPOT 动态检测是否可用于评价患者对抗结核治疗的反应，还需要更大规模、更全面的临床研究加以阐明。

结核分枝杆菌核酸荧光 PCR 检测原理是用一对结核分枝杆菌特异性引物和一条结核分枝杆菌特异性荧光探针，应用 PCR 方法体外扩增结核分枝杆菌 DNA，因此可以特异性诊断结核分枝杆菌。在本次统计中综合敏感度为 12.82%，特异度为 99.40%，其敏感度是最低的，阴性似然比为 0.88 为最高，约登指数 0.12 和 Kappa 值 0.15 为最低，说明发现病人与非病人的总能力较低，一致性较差，诊断价值相对较低。与文献^[7]比较，我们测定的敏感度低于文献报道 (57.7%)，考虑标本来源大部分为痰液、气管镜、灌洗液，尤其是痰液可能存在标本不合格的问题 (例如患者将唾液当作痰液送检)，气管镜、灌洗液存在被稀释的可能。换言之，即便是肺结核患者，但是当所取呼吸道标本中不包含病原体时，PCR 检测只能是阴性。另外需要对日常质控做好监测。由于该方法对标本要求高，我科室更多是用来进行无菌部位体液的检测。

抗结核抗体检测原理为应用间接固相免疫层析技术，当测试样本从样本孔向上迁移时，固定在膜上的结核抗原会与标本中的特异性抗体形成抗原-抗体复合物，再与标记有相应二抗的胶体金结合，形成肉眼可见的紫红色条带，质控线上的蛋白 A 也同时与金标二抗结合作为正确加入样本的标记。阴性并不能排除诊断。生产商实验数据表明

快速检测与细菌学检测有 72% 的一致性，另能检测 43% 细菌学阴性的结核病样本。在本次统计中，其特异度为 93.43% 相对较高，其诊断非病人能力较强，其他指标均无更大优势。我们实际工作中观察到在白细胞升高患者中有一定比例的弱阳性患者，分析可能炎症应激的机体内存在对该实验的干扰因素，因此该部分数据未纳入统计。但是该方法是所有方法中用时最短的方法，取血清测试仅需十分钟，因此在排除肺结核时，在时效性方面具有一定的应用空间。

抗酸染色是经典的细菌学诊断方法，在不能进行分枝杆菌培养的实验室，抗酸染色可以视为金标准。但是抗酸染色阳性不一定是结核分枝杆菌，非结核分枝杆菌、麻风杆菌抗酸染色也为阳性，诊断肺结核病时一定要联系临床症状和其他检查。并且显微镜检查存在主观因素，涉及检验人员涂片、染色、镜检的经验，并且标本留取合格率低，也影响了阳性率。在本次统计中，其敏感度 46.15%，特异度 99.70% 为最高，误诊率 0.3% 为最低，阳性预测值 98.90% 和阳性似然比为 153.83 均为最高，Kappa 值 0.52 排在第二位，说明该方法在诊断病人和排除非病人两方面具有相对较高的价值。

此外还有干扰素释放酶联免疫法 (TB-IGRA) 与蛋白芯片等方法也能更为有效地辅助诊断肺结核，文献报道 TB-IGRA 法与蛋白芯片法比较，无论是诊断肺结核还是肺外结核均具有阳性率比较高、敏感度亦高的优点，可用于结核病的早期筛查^[8]。我实验室暂无引进此项技术，有条件可以将更多的方法进行对比分析。

综合上述分析，在发热待查患者中，若考虑结核分枝杆菌感染的可能，在选择辅助检查时，T-SPOT 可作为重要的辅助手段，可以早期发现无活动性结核病灶的感染患者，通过干预可以避免发展为活动性结核，对结核的防治起到积极的作用，也可以发现那些需要定期随访的潜伏性结核分枝杆菌感染患者。抗酸染色作为经典的方法在诊断病人和排除非病人两方面具有相对较高的价值。抗结核抗体具有较高特异度和快速检测的能力，可发挥其高时效的特点，而 PCR 方法更适用于做无菌部位体液的检查，辅助诊断肺外结核。但是没有一种方法可以在所有诊断指标上有优秀表现，而且由于本研究并未明确患者免疫功能状态和使用免疫抑制剂等资料，这也影响对结果做进一步分析。因此，选择多种方法联合检测，并且密切结合临床表现、影像病理等资料，才能对肺结核做出正确的诊断。

参考文献：

[1] 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[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(11):1005-1008.
Yue J, Liang L, Li SH, et al. Clinical application of enzyme-linked immunospot assay for rapid diagnosis of active tuberculosis[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(11): 1005-1008.

[2] Zhang LF, Liu XQ, Zuo LY, et al. Longitudinal observation of an interferon gamma-released assay (T-SPOT. TB) for *Mycobacterium tuberculosis* infection in AIDS patients on highly active antiretroviral therapy[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(9): 1117-1121.

[3] Kim SH, Song KH, Choi SJ, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis in immunocompromised patients[J]. Am J Med, 2009, 122(2): 189-195.

[4] Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(11): 1192-1204.

[5] Ribeiro S, Dooley K, Hackman J, et al. T-SPOT. TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(1): 1-9.

[6] Adetifa IM, Ota MO, Jeffries DJ, et al. Interferon- γ ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 439-445.

[7] 段 静,王 艳,袁 杭,等. 结核杆菌五种实验室检测方法比较[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(4): 79-82.
Duan J, Wang Y, Yuan H, et al. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* in five kinds of laboratory tests [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4): 79-82.

[8] 归巧娣,刘 珂,苍金荣,等. 干扰素释放酶联免疫法(TB-IGRA)与蛋白芯片法检测结核分枝杆菌的方法比较[J]. 现代检验医学杂志,2014,29(5): 114-116.
Gui QD, Liu K, Cang JR, et al. Comparison of TB-IGRA and protein chip in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 114-116.

收稿日期:2015-05-23

修回日期:2015-08-24

(上接 133 页)胸腺肽 $\alpha 1$ 可能被截留,因此在制剂中检测不到胸腺肽 $\alpha 1$ 。对胸腺肽超滤工艺进行改进,可能提高制剂中胸腺肽 $\alpha 1$ 的含量。

参考文献:

[1] Goldstein AL, Asanuma Y, Battisto JR, et al. Influence of thymosin on cell-mediated and humoral immune responses in normal and in immunologically deficient mice[J]. Journal Immunology, 1970, 104(2): 359-366.

[2] Goldstein AL, Low TL, McAdoo M, et al. Thymosin $\alpha 1$: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide[J]. Immunology, 1977, 74(2): 725-729.

[3] Low TL, Thurman GB, McAdoo M, et al. The chemistry and biology of thymosin isolation, characterization, biological activities of thymosin $\alpha 1$ and polypeptide beta 1 from calf thymus[J]. Journal of Biological Chemistry, 1979, 254(3): 981-986.

[4] Leichtling KD, Serrate SA, Szeitein MB. Thymosin $\alpha 1$ modulates the expression of high affinity interleukin-2 receptors on normal human lymphocytes[J]. International Journal of Immunopharmacology, 1990, 12(1): 19-29.

[5] Favalli C, Jezzi T, Mastino A, et al. Modulation of natural killer activity by T $\alpha 1$ and interferon [J]. Cancer Immunol Immunother, 1985, 20(3): 189-190.

[6] 王家政,范 明. 蛋白质电泳技术[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-123.
Wang JZ, Fan M. The technology of protein electrophoresis [M]. Beijing: Sciences Publishing Company, 2000: 77-123.

[7] Swank RT, Munkres KD. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 39(2): 462-477.

[8] Schagger H, Von Jagow V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100kDa [J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368-379.

[9] 韩 香,顾 军,苑庆兰,等. 人胸腺肽 $\alpha 1$ 的固相合成及体外活性研究[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(1): 27-29.
Han X, Gu J, Yuan QL, et al. Study on fmoc solid-phase synthesis and activity of thymosin $\alpha 1$ [J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2004, 14(1): 27-29.

收稿日期:2015-10-23

修回日期:2015-12-18