

T-SPOT. TB 在肺结核早期诊断中的应用研究^{*}

施瑞洁¹, 刘文康¹, 范云¹, 李博¹, 刘榕¹, 王俊艳², 李玲¹, 闫福堂¹

(1. 陕西省人民医院检验科, 西安 710068; 2. 第四军医大学唐都医院, 西安 710038)

摘要:目的 探讨结核感染 T 淋巴细胞酶联免疫斑点试验 (tuberculosis T lymphocytes enzyme-linked immune SPOT test, T-SPOT. TB) 在肺结核早期诊断中的应用价值。方法 采用 T-SPOT. TB、荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, RQ-PCR)、结核蛋白芯片 (TB-Ab protein chip) 及结核菌素试验 (purified protein derivative, PPD) 检测 189 例疑似肺结核患者是否有结核菌感染。结果 T-SPOT. TB、PCR、TB-AB 和 PPD 方法的敏感度分别为 91.54% (119/130)、73.85% (96/130)、63.08% (82/130) 及 57.69% (75/130), 特异度分别为 89.83% (53/59)、86.44% (51/59)、67.79% (40/59) 及 66.10% (39/59); T-SPOT. TB 方法敏感度均高于荧光定量 PCR 法等三种方法 ($\chi^2 = 14.216 \sim 41.573$, 均 $P < 0.05$), T-SPOT. TB 方法特异度均高于 PPD 试验及结核蛋白芯片方法 ($\chi^2 = 8.577 \sim 9.669$, $P < 0.05$); T-SPOT. TB、荧光定量 PCR、TB-Ab 及 PPD 阳性预测值分别为 95.2% (119/125)、92.3% (96/104)、81.2% (82/101) 和 78.9% (75/95), 而阴性预测值分别为 82.8% (53/64)、60% (51/85)、45.5% (40/88) 和 41.5% (39/94); 四种检测方法的假阳性率 (误诊率) 分别为 10.2% (6/59)、13.6% (8/59)、32.2% (19/59) 和 33.9% (20/59), 而假阴性率 (漏诊率) 分别为 8.5% (11/130)、26.2% (34/130)、36.9% (48/130) 和 42.3% (55/130); 四种检测方法的阴性似然比分别为 0.11、0.16、0.48 和 0.51, 而阳性似然比分别为 9.0、5.4、2.0 和 1.7; 四种检测方法的诊断符合率分别为 91.0% (172/189)、77.8% (147/189)、64.6% (122/189) 和 60.3% (114/189); T-SPOT. TB、荧光定量 PCR、TB-Ab 及 PPD 的约登指数分别为 0.81、0.60、0.31 和 0.24。结论 在实验室检测早期结核菌感染的方法中 T-SPOT. TB 检测法是较敏感且特异度较高的方法, 对不同阶段肺结核诊断更具临床应用价值。

关键词: 肺结核; 荧光定量 PCR; 酶联免疫斑点试验; 结核蛋白芯片; 结核菌素试验

中图分类号: R521; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2017)02-060-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.016

Application of T-SPOT. TB in the Early Diagnosis of Tuberculosis

SHI Rui-jie¹, LIU Wen-kang¹, FAN Yun¹, LI Bo¹, LIU Rong¹, WANG Jun-yan²,

LI Ling¹, YAN Fu-tang¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Shaanxi

Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China; 2. the Tangdu Hospital

of Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** This study aims to explore the application value of tuberculosis T lymphocytes enzyme-linked immune SPOT test (T-SPOT. TB) on early diagnosis of tuberculosis. **Methods** The TB infection in 189 inpatients suspected tuberculosis in pneumology department of Shaanxi Provincial People's Hospital was detected with T-SPOT. TB, fluorescence RQ-PCR, tuberculosis (TB-Ab) protein chip and PPD methods. **Results** The sensitivity of four methods was 91.54% (119/130), 73.85% (96/130), 63.08% (82/130) and 57.69% (75/130) respectively and the specificity of those was 89.83% (53/59), 86.44% (51/59), 67.79% (40/59) and 66.10% (39/59), respectively. The sensitivity of T-SPOT. TB method was statistically higher than those of other three tests, respectively ($P < 0.05$). The specificity of T-SPOT. TB was significantly higher than those of TB-AB and PPD ($P < 0.05$), but there was no statistical difference between RQ-PCR and T-SPOT. TB ($P > 0.05$). The positive predictive values of T-SPOT. TB, fluorescent quantitative PCR, TB-Ab and PPD assays were 95.2% (119/125), 92.3% (96/104), 81.2% (82/101) and 78.9% (75/95) respectively while the negative predictive values of those were 82.8% (53/64), 60% (51/85), 45.5% (40/88) and 41.5% (39/94), respectively. The false-positive rates (misdiagnosis rate) of four assays were 10.2% (6/59), 13.6% (8/59), 32.2% (19/59) and 33.9% (20/59) respectively and the false-negative rates (rates of missed diagnosis) of those were 8.5% (11/130), 26.2% (34/130), 36.9% (48/130) and 42.3% (55/130), respectively. The negative likelihood ratios of T-SPOT. TB, fluorescent quantitative PCR, TB-Ab and PPD assays were 0.11, 0.16, 0.48 and 0.51 respectively, meanwhile the positive likelihood ratios of T-SPOT. TB, fluores-

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NO. 81272856)。

作者简介: 施瑞洁 (1971—), 女, 汉族, 本科, 主管检验技师, 研究方向免疫学检验技术, Tel: 13772029196。

通讯作者: 李玲 (1964—), 女, 研究生, 主任检验技师, 研究方向免疫学检验技术, Tel: 13193368899。

cent quantitative PCR, TB-Ab and PPD assays were 91.0%, 5.4, 2.0 and 1.7, respectively. What's more, the diagnostic accordance rates of the four assays were 91.0% (172/189), 77.8% (147/189), 64.6% (122/189) and 60.3% (114/189), respectively. **Conclusion** T-SPOT. TB test is a more sensitive and specific method and of great significance to the early diagnosis of TB, which has more clinical value in different stages of tuberculosis diagnosis.

Keywords: tuberculosis; fluorescence quantitative PCR; enzyme-linked immune spots (ELISPOT); TB-Ab chip; PPD

肺结核是一种慢性传染性疾病,根据世界卫生组织统计,目前感染肺结核人数大约占全球人口三分之一,并且因结核导致死亡的人数还在逐年增加,而由于其它类型传染性疾病导致死亡的人数还不及结核致死人数的二分之一,加之耐药结核菌株的增多及人口流动的增大,肺结核的治疗和控制形势日趋严峻,因此寻找一种快速有效的早期检测结核菌感染的方法显得尤为重要,目前结核检测方法有多种如荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, RQ-PCR), 结核蛋白芯片 (TB-Ab) 及结核菌素试验 (PPD), 近年来出现了结核 T 淋巴细胞酶联免疫斑点试验 (T-SPOT. TB) 法^[1], 本研究通过以上四种方法来检测该院疑似结核患者的结核菌感染来进行方法学评价。

1 材料及方法

1.1 研究对象 选择 2013 年 9 月~2016 年 4 月疑似结核的住院患者 189 例,其中男性 87 例,女性 59 例,年龄 17~74 岁,平均年龄 54.3 ± 6.2 岁,临床表现有不明原因发热,影像学检查显示正常。

1.2 试剂和仪器 荧光定量 PCR 检测 TB DNA 试剂盒购自福州泰普生物科学(中国)有限公司;结核抗体芯片及 PBT-X4 型生物芯片识别仪均购自南京大渊生物工程有限责任公司;T-SPOT. TB 检测试剂购自上海复星长征医学科学有限公司。

1.3 方法

1.3.1 T-SPOT. TB 检测

1.3.1.1 样本采集:抽取患者静脉血 5 ml 于肝素抗凝管内颠倒混匀 5~8 次,充分抗凝。分离外周血单个核细胞并计数,使得每个检验孔内有 25 万个细胞。

1.3.1.2 反应体系配制:按照每个测定标本需微孔培养板 4 孔(空白对照、测试孔 A 和测试孔 B、阳性质控对照),四个孔中分别加入 50 μ l 的细胞培养液、结核特异性抗原 ESAT-6(抗原 A)溶液、结核特异性抗原 CFP-10(抗原 B)溶液和阳性质控溶液;在 4 个检验孔中分别加入 100 μ l 的待测样本细胞并于 37℃ 含有 5 ml/dl CO₂ 培养箱中孵育 16~20 h。

1.3.1.3 斑点计数:从培养箱中取出培养板并弃去细胞培养液,每个反应孔中加入 200 μ l PBS 缓

冲液漂洗反应孔并弃去 PBS 缓冲液,重复洗涤至少三遍;用 PBS 缓冲液稀释标记抗体 200 倍为工作液,于 2~8℃ 孵育 1 h;弃去标记抗体工作液后用 PBS 缓冲液漂洗至少三遍;每个反应孔内加入 50 μ l 底物显色液室温放置 7 min 后用去离子水充分洗涤培养板终止反应;充分干燥培养板后于显微镜下计数每个反应孔内的深蓝色斑点。

1.3.1.4 结果判定:对照孔的斑点数应在 0~5;抗原 A 或抗原 B 孔斑点数减对照孔的斑点数 ≥ 6 , 结果判断为阳性;或抗原 A 或抗原 B 孔斑点数为 2 倍对照孔斑点数时亦可判断为阳性结果。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌 DNA:用胰酶消化法对痰液标本进行消化处理,对处理后的标本提取结核分枝杆菌基因组 DNA,用荧光定量 PCR 进行结核分枝杆菌 DNA 的扩增检测,操作按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 结核抗体芯片检测:在芯片盒窗口内加入 4 滴 A 试剂,待完全渗入膜后,放置室温 1 min,然后加入待测血清 100 μ l,等待血清完全渗入以后,再加 B 试剂 6 滴,待完全渗入后再加 C 试剂 10 滴,等待完全渗入,最终加入 D 试剂 6 滴。待反应完成,将结核抗体芯片放入芯片阅读仪内自动检测结果。

1.3.4 PPD 实验:于患者左前臂掌侧皮内注射 0.1 mg 含 5 μ l 结核菌素,注射后 72 h 观察结果,结果判定:PPD(-):硬结直径 < 5 mm;PPD(+):硬结直径 5~9 mm;PPD(++):硬结直径 10~19 mm;PPD(+++):硬结直径 ≥ 20 mm 或患者前臂注射部位出现明显水泡,甚至坏死。

1.3.5 方法学评价指标计算方法:特异度 = 真阴性人数 / (真阴性人数 + 假阳性人数) $\times 100\%$;灵敏度 = 真阳性人数 / (真阳性人数 + 假阴性人数) $\times 100\%$;阳性预测值 = 真阳性人数 / (真阳性人数 + 假阴性人数) $\times 100\%$;阴性预测值 = 真阴性人数 / (真阴性人数 + 假阳性人数) $\times 100\%$;假阳性率(误诊率) = 假阳性人数 / (真阴性人数 + 假阳性人数) $\times 100\%$;假阴性率(漏诊率) = 假阴性人数 / (真阳性人数 + 假阴性人数) $\times 100\%$;阴性似然比 = 假阴性率 / 真阴性率;阳性似然比 = 敏感度 / (1 - 特异性);诊断符合率 = [(真阳性数 + 真阴性数) / (真阳性数 + 假阳性数 + 真阴性数 + 假阴性数)] \times

100%;正确诊断指数即约登指数(Youden's index)=灵敏度+特异度-1。

1.4 统计学分析 采用SPSS17.0统计软件分析检测结果,定量检测结果采用($\bar{x} \pm s$)表示,定性资料采用百分率表示,不同方法间检测结果比较采用 t 检验或卡方检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 四种检测方法的敏感度与特异度比较 T-SPOT, PCR, TB-AB 和 PPD 方法的敏感度分别为 91.54% (119/130), 73.85% (96/130), 63.08% (82/130) 及 57.69% (75/130), 特异度分别为 89.83% (53/59), 86.44% (51/59), 67.79% (40/59) 及 66.10% (39/59); T-SPOT. TB 方法敏感度均高于荧光定量 PCR 法等三种方法($\chi^2 = 14.216 \sim 41.573, P < 0.05$), T-SPOT. TB 方法特异度均高于 PPD 试验及结核蛋白芯片方法($\chi^2 = 8.577 \sim 9.669, P < 0.05$), 而 T-SPOT. TB 方法特异度与 PCR 方法差异无统计学显著性意义($\chi^2 = 0.324, P > 0.05$)。

2.2 四种检测方法的阳性预测值和阴性预测值

T-SPOT. TB, 荧光定量 PCR, TB-Ab 及 PPD 的阳性预测值分别为 95.2% (119/125), 92.3% (96/104), 81.2% (82/101) 和 78.9% (75/95), 阴性预测值分别为 82.8% (53/64), 60% (51/85), 45.5% (40/88) 和 41.5% (39/94)。

2.3 四种检测方法的假阳性率(误诊率)和假阴性率(漏诊率)

T-SPOT. TB, 荧光定量 PCR, TB-Ab 及 PPD 的假阳性率(误诊率)分别为 10.2% (6/59), 13.6% (8/59), 32.2% (19/59) 和 33.9% (20/59), 假阴性率(漏诊率)分别为 8.5% (11/130), 26.2% (34/130), 36.9% (48/130) 和 42.3% (55/130)。

2.4 四种检测方法的阴性似然比和阳性似然比

T-SPOT. TB, 荧光定量 PCR, TB-Ab 及 PPD 的阴性似然比分别为 0.11, 0.16, 0.48 和 0.51, 阳性似然比分别为 9.0, 5.4, 2.0 和 1.7。

2.5 四种检测方法的诊断符合率 T-SPOT. TB, 荧光定量 PCR, TB-Ab 及 PPD 的诊断符合率分别为 91.0% (172/189), 77.8% (147/189), 64.6% (122/189) 和 60.3% (114/189)。

2.6 四种检测方法的约登指数(Youden's index)

T-SPOT. TB, 荧光定量 PCR, TB-Ab 及 PPD 的约登指数分别为 0.81, 0.60, 0.31 和 0.24。

3 讨论 结核病是一种由结核分枝杆菌感染的慢性传染病,其发病规律及其流行特点决定了其传染性强、危害性大,因此对结核的早期快速诊断成为

控制和治愈结核病的重要手段。目前根据送检标本不同对 TB 的检测多采用直接涂片、抗酸染色、增菌培养、罗氏培养、PCR 扩增法、结核蛋白芯片法及 PPD 试验等方法^[3~5]。上述方法对结核诊断的特异度、敏感度等各不相同,不能满足早期快速诊断结核病的要求^[6]。T-SPOT. TB 方法是基于效应 T 细胞被近期暴露的抗原在体外再次刺激后会释放 γ 干扰素的理论开发的,该方法利用结核特异抗原 ESAT-6 及 CFP-10 和酶联免疫斑点技术检测受检者体内是否存在结核效应 T 淋巴细胞,从而判断目前该受试者是否现症感染结核杆菌。目前 T-SPOT. TB 法检测 TB 显示其敏感度及特异度均较高^[2],由于抗凝血标本容易获得,检测结果不受其它因素的干扰,具有检测速度快,敏感度高,特异度强的优点,目前是实验室早期诊断结核的最佳选择。通过对 189 例患者检测结果进行统计分析,结果表明 T-SPOT. TB 检测法的灵敏度和特异度均高于 TB-Ab 法及 PPD 试验,而 T-SPOT. TB 法的敏感度高于荧光定量 PCR 法,但二者特异度无差异。荧光定量 PCR 法是采用聚合酶链式扩增及荧光标记探针技术检测标本中的结核分枝杆菌基因中的高度保守特异性核酸序列,其检测的阳性率受结核分枝杆菌数量的影响,当标本中细菌数量低于其检测的灵敏度时,检测结果会出现假阴性,导致患者漏诊^[7],但较之于其他检测法,荧光 PCR 检测法不受细菌耐药性及细菌细胞表型的影响,因此特异度较高。通过对荧光定量 PCR 检测法的敏感度及特异度进行分析,其结果明显高于结核蛋白芯片法及 PPD 实验法^[8~11]。PPD 检测法虽简单易行,但由于 PPD 法检测的成分为结核菌素纯蛋白衍生物,其组成与非结核分枝杆菌或与卡介苗有共同抗原成分,因此 PPD 检测法可能与接触过牛型分枝杆菌或与接种过卡介苗的人群发生交叉反应,甚至可能与免疫力低下或使用过免疫抑制剂的患者发生交叉反应,检测结果出现一定的假阳性,导致阳性率增高而特异度低。结核蛋白芯片检测法是通过检测结核分枝杆菌 IgG 抗体,根据抗原抗体特异反应原理,通过生物芯片识别仪进行分析从而判定是否受到结核分枝杆菌感染。实验结果表明,结核蛋白芯片检测法敏感度与特异度均低于 T-SPOT. TB 方法,可能原因是结核感染早期抗体还未出现,或免疫力低下的患者由于 IgG 亦可为阴性,结果出现假阴性,导致出现漏诊。另外结核蛋白芯片检测法受标本溶血或乳糜标本的影响,导致检测结果特异度降低。上述几种方法由于检测原理不同和标本类型的不同导致其检测结果的敏感度和特异度均不及 T-SPOT. TB 方法。

目前 T-SPOT. TB 用于结核分枝杆菌感染的检测在国外已有多年临床应用,取得了良好的临床效果,并且入选了一些发达国家包括美国的结核病防治指南,成为结核分枝杆菌感染检测的重要方法之一。国内的临床检测和研究也凸显了 T-SPOT. TB 方法具有推广价值,但尚需大样本的临床检测数据并进一步完善对 T-SPOT. TB 方法的全面评价。

参考文献:

- [1] 孟小蓉,包勇. 结核感染 T 细胞检测在结核病合并终末期肾病透析患者中的早期诊断价值[J]. 中华肺部疾病杂志,2013,6(3):71-74.
Meng XR, Bao Y. Early diagnostic value of T-SPOT. TB test in patients with tuberculosis and end-stage renal disease[J]. Chin J Lung Dis (Electronic Edition), 2013, 6(3):71-74.
- [2] Kampmann B, Whittaker E, Williams A, et al. Interferon gamma release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test[J]. Eur Respir J, 2009, 33(6):1374-1382.
- [3] 李林阳,陈林利,李琦. 结核感染 T 细胞斑点试验对肺结核的临床诊断价值[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版),2014,7(6):32-36.
Li LY, Chen LL, Li Q. Diagnostic value of Tuberculous infection of T cells spot test assay in pulmonary tuberculosis[J]. Chin J Lung Dis (Electronic Edition), 2014, 7(6):32-36.
- [4] 曾谊,冯袅,宋梅梅,等. 酶联免疫斑点试验在菌阴肺结核诊断中的价值[J]. 中国防痨杂志,2012,34(2):100-102.
Zeng Y, Feng X, Song MM, et al. Diagnostic value of enzyme-linked immunospot assay for diagnosis smear-negative pulmonary tuberculosis[J]. Chin J Antituberc, 2012, 34(2):100-102.
- [5] 张玉平,丁显平,张丽媛,等. T-SPOT. TB, 痰涂片和 TB-DNA 检查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.
Zhang YP, Ding XP, Zhang LY, et al. Comparative research of T-SPOT. TB sputum smear and TB-DNA test in the diagnosis of tuberculosis[J]. Journal of Chengdu Medical College, 2013, 8(1):49-51.
- [6] 李卓. T-SPOT 在肺结核及肺外结核诊断中的价值[J]. 中国实用医学,2016,11(5):65-66.
Li Z. The value of T-SPOT in the diagnosis of pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis[J]. Chinese Practical Medicine 2016, 11(5):65-66.
- [7] Cafforio P, Dammacco F, Germone A, et al. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(5):883-891.
- [8] 吴驰,张红梅,詹能勇,等. 荧光定量 PCR 技术在肺结核诊断中的临床应用研究[J]. 中国防痨杂志,2010,32(10):647-650.
Wu C, Zhang HM, Zhan NY, et al. The clinical application of fluorescent quantitative PCR in diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. Chin J Antituberc, 2010, 32(10):647-650.
- [9] 雷云. 荧光 PCR 诊断肺结核的临床应用研究[J]. 临床肺科杂志,2014,19(7):1278-1280.
Lei Y. Clinical application of fluorescent quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2014, 19(7):1278-1280.
- [10] 曹冉冉,刘邦英,周子人,等. 分子信标荧光定量 PCR 在肺结核早期诊断及疗效评价中的初步应用[J]. 中国防痨杂志,2012,34(2):103-106.
Cao RR, Liu BY, Zhou ZR, et al. Preliminary study on early diagnosis and efficacy evaluation of pulmonary tuberculosis based on molecular beacon real-time PCR[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2012, 34(2):103-106.
- [11] 荣兰香,马淑红,艾清,等. T-SPOT. TB 试验与 PPD 试验对结核病患者诊断价值相关性比较[J]. 中国实验诊断学,2013,17(8):1475-1476.
Rong LX, Ma SH, Ai Q, et al. Comparison of the results of T-SPOT. TB test and PPD test in the diagnosis of tuberculosis patients[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2013, 17(8):1475-1476.
- [12] 段静,王艳,袁杭,等. 结核分枝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.
- [13] 龚思翰,王水利,刘惠惠,等. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核性胸膜炎诊断中的研究进展[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(2):161-164.
Gong SH, Wang SL, Liu HH, et al. Research progress of tuberculosis infected T cells detection in the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(2):161-164.