

• 临床检验研究论著 •

T-SPOT. TB 和 ADA 在结核性胸膜炎中的诊断价值

廖 兵^{1,2}, 丁显平^{1△}

(1. 四川大学生命科学学院遗传医学研究所, 特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室, 四川成都 610064; 2. 重庆市第九人民医院检验科, 重庆 400700)

摘 要:目的 评价外周血结核杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)和胸腔积液腺苷脱氨酶(ADA)检测对结核性胸膜炎的辅助诊断价值。方法 前瞻性纳入疑诊结核性胸膜炎患者 62 例, 进行外周血 T-SPOT. TB、胸腔积液 ADA 检测, 利用 ROC 曲线探讨胸腔积液 ADA 诊断结核性胸膜炎的最佳临界值。结果 根据诊断及分组标准, 最终诊断结核性胸膜炎 24 例, 非结核性胸膜炎 33 例, 无法确定者 5 例, 外周血 T-SPOT. TB 诊断结核性胸膜炎的灵敏度为 91.7%, 特异度为 81.8%, 阳性预测值 78.6%, 阴性预测值 93.1%; 结核性胸膜炎组 ADA 活性为(40.5±15.4)IU/L, 非结核性胸膜炎组 ADA 活性为(12.4±9.5)IU/L, 差异有统计学意义($P<0.01$); 将 ADA 活性的临界值定为 22.5 IU/L, 其灵敏度和特异度分别为 83.3% 和 84.8%; 联合 T-SPOT. TB 与 ADA 检测灵敏度为 95.8%。结论 外周血 T-SPOT. TB 联合胸腔积液 ADA 对诊断结核性胸膜炎具有较高的灵敏度, 对疑似结核性胸膜炎患者的快速、准确诊断具有重要的辅助诊断价值。

关键词: 结核杆菌感染 T 细胞斑点试验; 腺苷脱氨酶; 结核性胸膜炎; 胸腔积液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.024

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2323-03

The diagnostic value of T-SPOT. TB and ADA for tuberculous pleurisy

Liao Bing^{1,2}, Ding Xianping^{1△}

(1. Sichuan-Chongqing Joint Key Laboratory for Bio-resource Research and Utilization, Institute of Medical Genetics, School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Department of Laboratory Medicine, the Ninth People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 400700, China)

Abstract: Objective To evaluate the diagnostic value of peripheral blood T-SPOT. TB and pleural effusion's adenosine deaminase(ADA) activity in patients with tuberculous pleurisy. **Methods** Sixty-two patients with suspected tuberculous pleurisy were enrolled in the study, whose peripheral blood T-SPOT. TB and pleural effusion ADA were measured and the best diagnostic threshold was determined by ROC curve. **Results** According to the diagnostic criteria of tuberculous pleurisy, 24 patients were diagnosed with tuberculous pleurisy, 33 were non-tuberculous pleurisy and 5 undiagnosed in the end. The sensitivity of T-SPOT. TB for the diagnosis of tuberculous pleurisy was 91.7%, the specificity was 81.8%, Positive predictive value was 78.6%, negative predictive value was 93.1%. The ADA activity was (40.5±15.4)IU/L in tuberculous pleurisy group, which was higher than in non tuberculous pleurisy group[(12.4±9.5)IU/L] ($P<0.01$). The cut-off value of ADA was 22.5 IU/L in tuberculous pleurisy diagnosis, while its sensitivity and specificity were 83.3% and 84.8% respectively. The sensitivity of the combined detection of T-SPOT. TB and ADA was 95.8%. **Conclusion** The combined detection of peripheral blood T-SPOT. TB and pleural effusion ADA has a higher sensitivity in diagnosis of tuberculous pleurisy, and has important auxiliary diagnostic value for patients with suspected tuberculous pleurisy.

Key words: T-SPOT. TB; adenosine deaminase; tuberculous pleurisy; pleural effusion

结核病是世界上单一致病菌引起死亡最多的疾病, 中国在 22 个结核病高发国家中排名第 2, 估计每年新发 130 万病例, 占全球结核病的 14.3%^[1]。结核性胸膜炎是一种常见的肺外结核病, 约有 5% 的肺结核合并有结核性胸膜炎, 是由结核分枝杆菌(MTB)及其代谢产物进入高敏状态的胸膜腔而引起的胸膜炎症^[2]。由于该病缺乏特异的临床表现, 细菌学方法检测阳性率低, 胸膜活检法为有创检查在临床上的使用有一定限制, 其早期诊断困难。结核杆菌感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)技术是近几年发展起来的细胞因子检测技术, 通过检测外周血中受 MTB 抗原刺激而活化的效应 T 细胞所释放的 γ -干扰素来诊断是否发生了 MTB 感染, 是目前诊断结核病以及结核性胸膜炎灵敏度较高的细胞学检测技术。T-SPOT. TB 技术在结核病发病率低的国家用于结核病的诊断具有较高的灵敏度与特异度, 但应用于结核性胸膜炎的诊断较少, 特别其在高发病率地区的诊断价值尚未确定^[3-5]。腺苷脱氨酶

(ADA)活性测定是诊断结核性胸膜炎重要工具^[6], 对诊断结核性胸膜炎和该病的疗效观察具有一定价值。本研究了 T-SPOT. TB 技术和胸腔积液的 ADA 活性检测对结核性胸膜炎的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 前瞻性纳入 2013 年 2 月至 2014 年 3 月于重庆市第九人民医院住院的疑诊结核性胸膜炎且伴有胸腔积液的患者 62 例, 其中男性 47 例(占 75.8%), 女性 15 例(占 24.2%), 年龄 17~86 岁, 中位年龄 56 岁。按照对结核性胸膜炎的诊断标准, 将上述人群分为结核性胸膜炎组和非结核性胸膜炎组。结核性胸膜炎组 24 例, 其中男性 19 例、女性 5 例, 年龄 17~75 岁, 中位年龄 44 岁; 非结核性胸膜炎组 33 例, 其中男性 23 例、女性 10 例, 年龄 37~86 岁, 中位年龄 63 岁, 包括恶性胸腔积液患者 25 例, 心源性、反应性、细菌性胸膜炎共 8 例; 5 例患者不能确诊病例或资料记录不全。结核性胸膜炎诊

断符合以下标准:(1)患者有不同程度发热、咳嗽、胸痛、乏力等
症状;(2)影像学显示不同程度的胸腔积液以及肺内或其他部
位有与结核病相符的病变;(3)结核菌素皮肤(PPD 试验)试验
阳性或强阳性;(4)胸腔积液为渗出性,淋巴细胞百分率大于或
等于 50%,ADA 大于或等于 40 IU/L,抗结核抗体阳性,MTB
DNA 阳性,胸腔积液沉渣涂片或培养 MTB 阳性 4 项中至少
满足其中一项;(5)抗结核治疗有效;(6)胸膜活检或胸腔镜活
检明确诊断为结核病变。

1.2 方法

1.2.1 T-SPOT. TB 检测 肝素钠抗凝管采集患者外周血 5
mL,淋巴细胞分离液分离出外周血单个核细胞,AIM-V 培养
液将细胞浓度调整为 2.5×10^6 /mL。取出 T-SPOT. B 试剂盒
(英国 Oxford Immunotec Ltd. 产品),在预先包被有抗 γ -干扰
素抗体的微孔板上,由上至下 4 个微孔中依次分别加入 50 μ L
植物血凝素作为阳性对照孔,50 μ L ESAT-6 抗原作为 A 孔,
50 μ L CFP-10 抗原作为 B 孔,50 μ L AIM-V 培养液作为阴性
对照孔。最后在上述 4 孔中各加入 100 μ L 细胞稀释工作液,
将培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的培养箱孵育 16~20 h,用 PBS
洗板 4 次,加入碱性磷酸酶标记的二抗,在 2~8 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h,
PBS 洗板 4 次,加底物常温避光条件下显色 7 min,蒸馏水冲洗
并终止反应。结果判断:显微镜或放大镜进行斑点计数。当测
试孔 A 或 B 达到以下标准则判定为阳性结果:阴性对照斑点
数为 0~5 个,A 或 B 孔斑点数减阴性孔斑点数大于或等于 6,
判断为阳性;阴性对照斑点数大于或等于 6,A 或 B 孔斑点数
大于或等于 2 倍阴性孔,判断为阳性;若 A、B 孔斑点数不够以
上标准,且阳性对照反应良好,则为阴性。

1.2.2 胸腔积液 ADA 检测 ADA 检测采用速率法,试剂为
四川迈克科技有限公司生产,仪器采用日立 HITACHI 7600-
020 型全自动生化分析仪。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件,计数资料以百
分率表示,百分率的比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计
学意义。

2 结 果

2.1 外周血 T-SPOT. TB 技术检测结果 结核性胸膜炎组 24
例患者中 22 例为阳性,非结核性胸膜炎组 33 例中 6 例为阳
性,T-SPOT. TB 技术用于非结核胸膜炎与结核性胸膜炎鉴别
诊断的灵敏度为 91.7%,特异度为 81.8%,假阳性率为 18.2%
(6/33),假阴性率为 8.3%(2/24),阳性预测值为 78.6%,阴性
预测值为 93.1%。

2.2 胸腔积液 ADA 检测结果 结核性胸膜炎组 ADA 活性
为 (40.5 ± 15.4) IU/L,非结核性胸膜炎组 ADA 活性为
 (12.4 ± 9.5) IU/L,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 ADA 值诊断结核性胸膜炎的灵敏度、特异度及临界值
利用 ROC 曲线计算胸腔积液 ADA 检测用于诊断结核性胸膜
炎的 ROC 曲线下面积为 0.959(95%CI:0.916~1.000),胸腔
积液 ADA 检测对结核性胸膜炎具有较高诊断价值,而当约登
指数(灵敏度+特异度-1)达到最大值时,取 ADA 临界值为
22.5 IU/L,此时 ADA 检测用于诊断结核性胸膜炎的灵敏度和
特异度分别为 83.3%和 84.8%。本文确定的 ADA 临界值
与传统的 ADA 临界值进行比较,见表 1。

2.4 联合外周血 T-SPOT. TB 与胸腔积液 ADA 对结核性胸
膜炎的诊断价值 联合应用 T-SPOT. TB 技术及胸腔积液
ADA 检测(以 ADA>22.5 IU/L 为阳性),用于非结核胸膜炎
与结核性胸膜炎鉴别诊断的灵敏度达到 95.8%,见表 2。

表 1 本文确定的 ADA 临界值与传统的 ADA 临界值比较

方法类型	ADA 临界值(IU/L)	灵敏度	特异度	约登指数
传统临界值	40.0	0.542	1.000	0.542
本文的临界值	22.5	0.833	0.848	0.681

表 2 两种检测项目对结核性胸膜炎的诊断价值

检测项目	<i>n</i>	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
T-SPOT. TB	24	22	91.7
ADA	24	20	83.3
T-SPOT. TB、ADA 联合	24	23	95.8

3 讨 论

MTB 感染机体后,引起固有免疫及获得性免疫,特异性的
中央型记忆淋巴细胞和效应型记忆淋巴细胞在机体中长期存
在^[7-9],其免疫反应主要由细胞介导。T 细胞被致敏,当再次抗
原刺激时,能迅速活化增殖,释放 γ -干扰素。酶联免疫斑点法
(ELISPOT)是近 20 年发展起来的检测抗原特异性 T 细胞的
技术,是目前最敏感的检测抗原特异性 T 细胞的方法之一,可
以检测出 1/100 000~1/500 000 外周血单个核细胞中经某种
抗原刺激后释放某种细胞因子的细胞,经过酶联显色后,对斑
点进行计数,1 个斑点代表 1 个细胞,从而计算出抗原特异性
细胞数。T-SPOT. TB 是应用 ELISPOT 技术检测经 ESAT-6
和 CFP-10 抗原刺激后释放 γ -干扰素的特异性 T 细胞数量来
诊断结核感染的方法。由于 ESAT-6 和 CFP-10 这两种蛋白由
MTB 的 RD1 基因序列合成,而该基因序列仅存在于致病性
MTB 之中,环境中的非典型分枝杆菌和卡介苗中均不含该基
因序列,故将上述两种结核感染的特异性抗原作为刺激物来进
行检测,从理论上保证了 T-SPOT. TB 的高度特异性^[10]。本
研究诊断结核性胸膜炎的灵敏度为 91.7%,特异度为 81.8%,
与郑春燕等^[11]报道的灵敏度为 85.7%,特异度为 80.0%相
近,说明了 T-SPOT. TB 对于结核性胸膜炎的诊断具有较高的
灵敏度与特异度。

ADA 是活动性结核辅助性 T 淋巴细胞的一种标志物,活
动性结核时,细胞免疫受刺激,淋巴细胞增多,细胞内的 ADA
进入胸腔积液中,因而结核性胸膜炎时胸腔积液中的 ADA 活
性增高。本研究显示结核性胸膜炎组 ADA 活性为 $(40.5 \pm$
 $15.4)$ IU/L,非结核性胸膜炎组 ADA 活性为 (12.4 ± 9.5) IU/
L,差异有统计学意义($P < 0.01$)。利用 ROC 曲线,在约登指
数达到最大值时取 ADA 临界值为 22.5 IU/L,其诊断结核性
胸膜炎的灵敏度比传统临界值(40 IU/L)用于诊断的灵敏度
(54.2%)明显提高,特异度 84.8%则比传统方法稍低。本文
报道的 ROC 曲线计算出的 ADA 临界值为 22.5 IU/L,与罗虎
等^[12]报道的 23.3 IU/L 相近,比 Tay 等^[13]报道的 26 IU/L
稍低。

本研究通过联合检测外周血 T-SPOT. TB 及胸腔积液
ADA 活性,其诊断灵敏度显著提高,达到了 95.8%,这两个检
测项目均检测快速,24 h 就能报告结果且具有较高的灵敏度
与特异度,可作为结核性胸膜炎诊断的辅助诊断技术。

本研究存在一定的局限性,主要是纳入研究的患者例数较
少。中国作为 MTB 感染的高流行区,存在较高比例的潜伏性
MTB 感染者,鉴于目前缺乏其他诊断潜伏性 MTB 感染的手
段,使得完全排除 MTB 感染比较困难,为评价 T-SPOT. TB 检
测的特异性带来挑战。结核性胸膜炎患者机体的免疫细胞受
感染局部细胞因子的趋化作用在胸腔聚集,抗原特异性细胞较

外周血显著增多。Liu 等^[14]对 168 例胸腔积液患者进行前瞻性研究,发现胸腔积液 T-SPOT. TB 检测与外周血 T-SPOT. TB 检测的灵敏度相似,但特异性明显提高,其检测特异度分别为 94.5%和 76.1%。Zhang 等^[15]对 167 例胸腔积液患者同时进行胸腔积液和外周血 T-SPOT. TB 检测,发现胸腔积液 T-SPOT. TB 的灵敏度与特异度明显高于外周血,且斑点数为外周血的 4.6 倍,说明胸腔积液检测 T-SPOT. TB 对诊断活动性结核疾病意义更大,更能准确诊断结核感染。

综上所述,外周血 T-SPOT. TB 联合胸腔积液 ADA 检测对诊断结核性胸膜炎具有较高的灵敏度,对疑似为结核性胸膜炎的患者进行快速而准确的诊断具有重要的辅助诊断价值,但是改用胸腔积液单个核细胞 T-SPOT. TB 检测可能比使用外周血进行检测有更好的特异度。

参考文献

[1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨通讯,2012,34(8):485-508.

[2] 卜建玲,马玛. 结核性胸膜炎的诊断现状与研究进展[J]. 中国防痨杂志,2009,31(1):33-36.

[3] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update [J]. Ann Intern Med,2008,149(3): 177-184.

[4] Lee SS, Chou KJ, Su IJ, et al. High prevalence of latent tuberculosis infection in patients in end-stage renal disease on hemodialysis: Comparison of QuantiFERON-TB GOLD, ELISPOT, and tuberculin skin test[J]. Infection,2009,37(2):96-102.

[5] Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin,2010,28(4):245-252.

[6] Khoo-Ean N, Booraphun S, Aekphachaisawat N, et al. Adenosine

deaminase activity level as a tool for diagnosing tuberculous pleural effusion[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health,2013,44(4): 655-659.

[7] Fritsch RD, Shen X, Sims GP, et al. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27 [J]. J Immunol,2005,175(10): 6489-6497.

[8] Beverley PC. Primer: making sense of T-cell memory[J]. Nat Clin Pract Rheumatol,2008,4(1): 43-49.

[9] Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design[J]. Nat Rev Immunol, 2008,8(4): 247-258.

[10] 张丽帆,刘晓清. γ 干扰素释放分析 T-SPOT. TB 诊断结核感染临床应用进展[J]. 中国医学科学院学报,2009,31(4):506-510.

[11] 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.

[12] 罗虎,宫亮,周向东. 胸腔积液 ADA 值在结核性胸膜炎中的诊断价值及临界值探讨[J]. 重庆医学,2012,41(35):3718-3719.

[13] Tay TR, Tee A. Factors affecting pleural fluid adenosine deaminase level and the implication on the diagnosis of tuberculous pleural effusion: a retrospective cohort study [J]. BMC Infect Dis,2013,13(1):546.

[14] Liu F, Gao M, Zhang X, et al. Interferon-gamma release assay performance of pleural fluid and peripheral blood in pleural tuberculosis [J]. PLoS One,2013,8(12):e83857.

[15] 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):e85030.

(收稿日期:2014-05-08)

(上接第 2322 页)

预后提高生存质量的关键。大量流行病学及分子生物学研究已经证明,HPV 感染是宫颈癌及宫颈上皮肉瘤样病变的主要病因。不同型别 HPV 的致病性不同,以高危型 HPV 持续感染最为严重,因此,HPV 检测及分型对宫颈癌的筛查,早期诊断、防治和预后判断等均具有重要的临床价值。

目前国内大多数三甲医院已经开展 HPV 分子检测作为常规筛查宫颈病变的手段,HPV 检测筛查宫颈癌是一种经济而又相对高效的筛查方案,而且其特异度较高,误诊率较低。研究提示,HPV 感染率随宫颈病变程度的加重而明显升高,在宫颈癌组中 HPV 感染率极高^[10]。HPV 感染多发生在性活跃期,大部分妇女都是短暂性的 HPV 感染,通常在 8~15 个月消失,只有少数高病毒载量长期持续感染者才会导致宫颈癌前病变及宫颈癌的发生。有研究表明,HPV 感染型别、宿主免疫状态、HPV 持续感染与宫颈癌密切相关^[11]。一次 HPV 筛查阳性并不意味宫颈已处于癌前病变阶段。明确 HPV 感染的型别,对 HPV 感染的治疗、宫颈癌的预防、流行病学调查及其基因疫苗的研制均有重要意义。

参考文献

[1] 崔英,胥爱辉,蔡永娥,等. 人乳头瘤病毒(HPV)致宫颈癌的分子机制研究[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(1):143-145.

[2] Nomellini RS, Barcelos AC, Michelin MA, et al. Utilization of human papillomavirus testing for cervical Cancer prevention in a university hospital[J]. Cad Saude Publica,2007,23(6): 1309-1318.

[3] 单玉珍,马向东,刘明晖,等. 西安市长安区妇科就诊妇女高危型 HPV 感染及亚型分布调查研究[J]. 中国现代医药杂志,2012,14(4):38-41.

[4] 靳琼,沈铿,李辉,等. 西藏自治区妇女子宫颈乳头状瘤病毒感染现状调查及相关因素分析[J]. 中华妇产科杂志,2009,44(12): 898-902.

[5] 张健,孟和宝力高,赵文双,等. 呼和浩特地区宫颈疾病患者人乳头状瘤病毒-DNA 分型检测分析[J]. 华北国防医药,2010,44(2): 124-125.

[6] 陶萍萍,张国荣,卞美璐,等. 妇科门诊 21 种人乳头状瘤病毒感染状况分析[J]. 中日友好医院学报,2008,22(4):208-211.

[7] 杨英捷,赵健,李雪倩,等. 2285 例女性下生殖道人乳头状瘤病毒感染筛查结果分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2006,22(6): 444-445.

[8] Valdespino VM, Valdespino VE. Cervical Cancer screening: state of the art[J]. Curr Opin Obstet Gynecol,2006,18(1): 35-40.

[9] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2): 74-108.

[10] Bello BD, Spinillo A, Alberizzi P, et al. Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes: prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions [J]. J Med Virol,2009,81(4): 703-712.

[11] Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, et al. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia [J]. Int J Cancer,2006,118(5):1187-1193.

(收稿日期:2014-06-01)