

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.05.40

❖ 论著 ❖

联合检测 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 在活动性肺结核中的临床意义

刘裔, 韩红洋

(南京市第二医院结核科, 江苏 南京 210000)

【摘要】目的: 分析联合检测 γ -干扰素释放试验(T-SPOT. TB)、结核菌素试验(PPD)、血清结核抗体检测(TB-Ab)在活动性肺结核(APTB)中的临床意义。**方法:** 选取60例疑似 APTB 患者为研究对象, 均行 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 检测, 以最终确诊结果为准, 分析三种方法单独及联合检测的临床意义。**结果:** 60 例患者, 确诊为 APTB 26 例, 34 例为非 APTB; T-SPOT. TB 结果显示, APTB 患者结核特异细胞斑点数高于非 APTB 患者 ($P < 0.05$); T-SPOT. TB 诊断 APTB 的灵敏度、特异度、准确度分别为 88.46%、91.18% 和 90.00%, PPD 诊断 APTB 的灵敏度、特异度和准确度分别为 57.69%、67.65% 和 63.33%, TB-Ab 诊断 APTB 的灵敏度、特异度和准确度分别为 61.54%、67.65%、65.00%, T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 联合检测诊断效能最高, 其诊断灵敏度 96.15%、特异度 100.00%、准确度 98.33% 均高于三者单项或两项(T-SPOT. TB + PPD、T-SPOT. TB + TB-Ab、PPD + TB-Ab)联合检测 ($P < 0.05$)。**结论:** 联合检测 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 可提高对 APTB 的诊断效能, 值得在临床推广实践。

【关键词】 γ -干扰素释放试验; 结核菌素试验; 血清结核抗体检测; 活动性肺结核; 临床意义

【中图分类号】 R521 **【文献标志码】** A

Clinical significance of combined detection of T-SPOT. TB, PPD and TB-Ab in active pulmonary tuberculosis

LIU Yi, HAN Hong-yang

(Department of Tuberculosis, Nanjing Second Hospital, Nanjing 210000, Jiangsu, China)

【Abstract】Objective: To analyze the clinical significance of combined detection of interferon - gamma release assay (T-SPOT. TB), Purified Protein Derivative of tuberculin (PPD) and serum tuberculosis antibody (TB-Ab) in active pulmonary tuberculosis (APTB). **Methods:** A total of 60 suspected APTB patients were enrolled in the study. T-SPOT. TB, PPD and TB-Ab were performed on them. Taking the final diagnosis results as the standard, the clinical significance of the three methods and their combination detection was analyzed. **Results:** In the 60 patients, there were 26 cases with APTB, 34 cases with non-APTB. T-SPOT. TB results showed that number of tuberculosis-specific cells in APTB patients was higher than that in non-APTB patients ($P < 0.05$). The sensitivity, specificity and accuracy of T-SPOT. TB for the diagnosis of APTB were 88.46%, 91.18%, and 90.00%, respectively. The above 3 indexes of PPD were 57.69%, 67.65% and 63.33%, respectively. The above 3 indexes of TB - Ab were 61.54%, 67.65% and 65.00%, respectively. The diagnostic efficiency of T-SPOT. TB, PPD and TB-Ab combined detection was the highest. And the diagnostic sensitivity, specificity and accuracy were 96.15%, 100.00 and 98.33%, respectively, which were higher than those of single or two of the three (T-SPOT. TB + PPD, T-SPOT. TB + TB-Ab, PPD + TB-Ab, $P < 0.05$). **Conclusion:** Combined detection of T-SPOT. TB, PPD and TB-Ab can improve the diagnostic efficiency for APTB, which is worthy of clinical application.

【Key words】 T-SPOT. TB; PPD; TB-Ab; Active pulmonary tuberculosis; Clinical significance

结核病具有传染性强、发病率高、隐匿性强、临床症状不典型等特点, 其中活动性肺结核 (activity pulmonary tuberculosis, APTB)^[1] 的早期诊治是临床研究的热点。目前, 诊断 APTB 的方法主要有结核菌培养、抗酸杆菌涂片、结核菌素试验 (PPD)、血清

结核抗体检测 (TB-Ab) 等, 但存在检测时间长、敏感度低、假阳性与假阴性率高等不足^[2]。TSPOT. TB 检测法为应用结核特异抗原 A (ESAT-6) 和抗原 B (CFP-10) 经酶联免疫斑点技术 ELISPOT 检测受试者体内是否有结核效应 T 淋巴细胞, 继而判断是否

存在感染结核杆菌,该方法有较高灵敏性、特异性^[3-4]。本研究主要分析联合检测 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 在 APTB 中的临床意义。

1 资料及方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 8 月至 2018 年 5 月南京市第二医院收治的 60 例疑似 APTB 患者为研究对象。纳入标准:(1)符合相关诊断标准^[5],存在肺结核典型改变,痰涂片呈阳性;(2)无严重肝肾功能不全或心功能不全疾病等原发病;(3)同意并签署知情同意书。排除标准:(1)资料不完整或诊治过程中依从性差者及失访者;(2)入组前曾经抗结核治疗 1 个月以上者;(3)无明确细菌学或病理学诊断,无法确诊者。60 例患者中,男性 36 例,女性 24 例;年龄 35 ~ 74 岁,平均(54.67 ± 5.59)岁。本研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 T-SPOT. TB 检测 采集 3 mL 外周血,密度梯度离心法分离,制备外周单个核细胞,转移到洁净离心管,无血清培养液 AIM-V 洗涤细胞,将内源性 γ 干扰素 (IFN- γ) 去除。制备 250 万细胞/mL 标准细胞稀释液,取出培养板后,在每孔中加入含 25 万 PBMC 的细胞稀释液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 下孵育 16 ~ 20 h,以磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 4 次,各孔加入酶抗抗体溶液,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,PBS 洗涤 4 次,酶联显色,干燥培养板。TSPOT. TB 试验有效标准:阴性对照孔内斑点形成细胞计数在 10 个以下,同时,阳性对照孔内斑点形成细胞计数在 20 个以上,阳性判读标准:(1)隐性对照孔斑点数 < 6 个,且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数 - 阴性对照孔斑点数 > 6 个;(2)阴性对照孔斑点个数 > 6 个,且抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数 > 两倍的阴性对照孔斑点数。满足阳性结果判读标准中任意一条即为阳性,否则为阴性^[6]。

1.2.2 PPD 检测 于左前臂掌侧前 1/3 中央皮内注射 5 IU 结核菌素,以局部出现 7 ~ 8 mm 的圆形橘皮样皮丘为宜。72 h (48 ~ 96 h) 检查反应,以皮肤硬结为准:(1)阴性 (-) 指硬结的平均直径 < 5 mm 或无反应者。(2)阳性反应 (+) 指硬结的平均直径 \geq 5 mm 者,其中硬结平均直径 \geq 5 mm,且 < 10 mm 为一般阳性;硬结平均直径 \geq 10 mm,且 < 15 mm 为中度阳性;硬结平均直径 \geq 15 mm 或局部出现双圈、水泡、坏死及淋巴管炎者为强阳性。PPD 试验判断 APTB 的标准:(1)一般情况下,在无卡介苗接种及肺结核分枝杆菌干扰时,PPD 反应硬结 \geq 5 mm 应视为已受结核菌感染;(2)在卡介苗接种地区和或肺

结核分枝杆菌感染流行地区,以 PPD 反应 \geq 10 mm 为结核感染标准;(3)在卡介苗接种地区和或肺结核分枝杆菌流行地区,对 HIV 阳性、接受免疫抑制剂 > 1 个月,PPD 反应 \geq 5 mm 为结核感染;(4)与涂片阳性肺结核有密切接触的 5 岁以下儿童,PPD 反应 \geq 5 mm 为结核感染;(5)PPD 反应 \geq 15 mm 及以上或存在水泡、坏死、淋巴管炎等为结核感染强反应。

1.2.3 TB-Ab 检测 以胰酶消化法对痰液标本进行消化处理,对处理后标本采用美国 BD 公司 Bactec Mgit 960 型快速培养仪对分枝杆菌进行培养,抗酸染液染色 (珠海 BASO 生物科技有限公司),提取结核分枝杆菌基因组 DNA,以荧光定量 PCR 法对结核分枝杆菌 DNA 进行扩增检测,于芯片盒窗口内加入 4 滴 A 剂,待完全渗入后,加 6 滴 B 试剂,在血清完全渗入后依次加 B 试剂 6 滴、C 试剂 10 滴、D 试剂 6 滴,反应完成后,结核抗体芯片置入芯片阅读仪自动进行检测。TB-Ab-IgG 结核抗体检测试剂盒购自新加坡 MP 生物医学公司。

1.3 观察指标

以临床明确诊断结果为准,分析 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 单独、两联或三者联合检测的临床意义。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行处理。计数资料采用 [n(%)] 表示,组间比较采用 χ^2 检验;非正态分布计量资料采用中位数 (四分位数间距) 表示,组间对比行 Wilcoxon 秩和检验,两变量间相关性以 Spearman 法进行相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诊断结果

经结核杆菌培养、组织病理结果、医学影像学结果与临床症状,明确诊断为 APTB 患者 26 例 (43.33%),34 例为非 APTB (56.67%)。

2.2 T-SPOT. TB 检测结果

APTB 和非 APTB 分别 26 例和 34 例;APTB 患者结核特异细胞斑点数高于非 APTB 患者 ($P < 0.05$)。见表 1、表 2。T-SPOT. TB 诊断 APTB 的灵敏度、特异度、准确度分别为 88.46% (23/26)、91.18% (31/34)、90.00% (54/60)。

2.3 PPD 检测结果

APTB 和非 APTB 分别 26 例和 34 例。见表 3。PPD 诊断 APTB 的灵敏度、特异度、准确度分别为 57.69% (15/26)、67.65% (23/34)、63.33% (38/60)。

表 1 T-SPOT. TB 检测结果

类型	诊断结果		合计
	APTb	非 APTb	
APTb	23	3	26
非 APTb	3	31	34
合计	26	34	60

表 2 T-SPOT. TB 检测结果

类型	结核特异细胞斑点数 [M(P25% ~ P75%)]	
APTb (n = 26)	3 (1 ~ 5)	
非 APTb (n = 34)	19 (9 ~ 29)	
Z 值	15.769	
P 值	<0.001	

表 3 PPD 检测结果

类型	明确诊断结果		合计
	APTb	非 APTb	
APTb	15	11	26
非 APTb	11	23	34
合计	26	34	60

2.4 TB-Ab 检测结果

APTb 和非 APTb 分别 27 例和 33 例。见表 4。TB-Ab 诊断 APTb 的灵敏度、特异度、准确度分别为 61.54% (16/26)、67.65% (23/34)、65.00% (39/60)。

表 4 TB-Ab 检测结果

类型	明确诊断结果		合计
	APTb	非 APTb	
APTb	16	11	27
非 APTb	10	23	33
合计	26	34	60

2.5 诊断效能比较

T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 联合检测灵敏度、特异度、准确度均最高,且高于三者单项或两项 (T-SPOT. TB + PPD、T-SPOT. TB + TB-Ab、PPD + TB-Ab) 联合检测 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 诊断效能比较 [%]

诊断方法	灵敏度	特异度	准确度
T-SPOT. TB	88.46(23/26)	91.18(31/34)	90.00(54/60)
PPD	57.69(15/26)*	67.65(23/34)*	63.33(38/60)*
TB-Ab	61.54(16/26)*	67.65(23/34)*	65.00(39/60)*
T-SPOT. TB + PPD	92.31(24/26) ^{#△}	91.18(31/34) ^{#△▲}	91.17(55/60) ^{#△▲}
T-SPOT. TB + TB-Ab	96.15(25/26) ^{#△}	94.12(32/34) ^{#△▲}	95.00(57/60) ^{#△▲}
PPD + TB-Ab	76.92(20/26) [#]	73.53(25/34) ^{#▲}	75.00(45/60)*▲
T-SPOT. TB + PPD + TB-Ab	96.15(25/26) ^{#△}	100.00(34/34)*△	98.33(59/60) ^{#△}

* $P < 0.05$, 与 T-SPOT. TB 比较; # $P < 0.05$, 与 PPD 比较; △ $P < 0.05$, 与 TB-Ab 比较; ▲ $P < 0.05$, 与 T-SPOT. TB + PPD + TB-Ab 比较。

3 讨论

APTb 是一种慢性呼吸系统疾病,病原菌为结

核分枝杆菌,主要经空气-飞沫传播,结核杆菌常侵犯肺脏而引起肺结核,结核病因传染性强,可侵犯损害多器官,严重威胁人类健康^[7]。目前,T-SPOT. TB、PPD、TB-Ab 为筛选 APTb 的最有效方法,其中 T-SPOT. TB 及结核蛋白芯片为近几年发展起来的快速诊断结核病新技术,可快速检测结核菌,所选的抗原是致病性结核分枝杆菌特有但卡介苗没有的片段,因此能较好区分真性结核感染,避免卡介苗接种、非结核分枝杆菌感染造成的干扰^[8]。与 PPD、TB-Ab 相比,T-SPOT. TB 检测 APTb 具有更高的灵敏度、特异度、准确度^[9-10]。但目前关于 T-SPOT. TB、PPD、TB-Ab 三者联合检测对 APTb 的诊断价值报道较少。

孟苏凯等^[11]报道细菌学方法检测 APTb 敏感度为 49.75%,TB-Ab-IgG 检测总体敏感度为 56.6%,联合检测后,敏感度为 83.1%。施瑞洁等^[12]发现,T-SPOT. TB 在肺结核早期中的诊断灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 91.54%、89.83%、95.2%、82.8%,PPD 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 57.69%、66.10%、78.90%、41.50%。本研究显示,T-SPOT. TB 诊断 APTb 的灵敏度、特异度、准确度分别为 88.46%、91.18%、90.00%,PPD 诊断 APTb 的灵敏度、特异度、准确度分别为 57.69%、67.65%、63.33%,TB-Ab 诊断 APTb 的灵敏度、特异度、准确度分别为 61.54%、67.65%、65.00%,与上述报道结果相似,表明三者均对 APTb 有一定诊断价值,其中 T-SPOT. TB 诊断 APTb 的效能最好。原因在于 T-SPOT. TB 试验采用酶联免疫斑点技术,利用结核分支杆菌 RD1 区基因编码产生的 ESAT-6 及 CFP-10 可刺激机体 T 淋巴细胞,产生特异性细胞因子 IFN- γ 的原理,而准确判断患者是否存在结核分枝杆菌感染,因而诊断效能高^[13]。但本研究也发现 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 联合检测诊断效能最高,且其诊断灵敏度为 96.15%,特异度为 100.00%,准确度为 98.33%,与宋瑞红等^[14]报道的结果一致。说明 T-SPOT. TB、PPD 及 TB-Ab 联合检测对 APTb 有较高诊断价值。T-SPOT. TB 试验有较高敏感性与特异性,但单纯采用 T-SPOT. TB 试验的特异性评价也有一定局限性,如肺癌患者 T-SPOT. TB 阳性率较高,考虑同肿瘤患者免疫力低下、易合并潜伏性结核感染等关系密切,会导致 T-SPOT. TB 特异性下降,此外我国为结核感染高发国家,这些原因均可能导致 T-SPOT. TB 特异性较低^[15]。PPD 试验操作简便、快速,但敏感度受患者免疫力影响,在免疫力低下人群的敏感度较低,使用的纯蛋白衍生物与卡介

苗中部分抗原成分相同,会产生交叉反应,因而假阳性率高,结核菌培养时间长,受临床标本影响,不利于早期诊断^[16]。血清 TB-Ab 试验有操作简单、检测快速等优点,在临床应用较广泛,但其溶血样本和高脂血样本可能受免疫功能影响,在疾病急性感染早期即出现阴性结果,因而 TB-Ab 法诊断 APTB 的敏感度、特异度不高,限制了疾病诊断与有效治疗。将 T-SPOT. TB、PPD、TB-Ab 联合检测用于 APTB 的诊断,可起到互补作用,其中 T-SPOT. TB 试验避免了 PPD 实验中可能存在的抗原交叉反应,受干扰因素较少,有较高特异性,结合 TB-Ab 后从体液免疫与细胞免疫方面进行检测,对提高诊断准确率有互补作用。

综上所述,T-SPOT. TB、PPD、TB-Ab 联合检测在 APTB 中有较高临床检测意义,可提高诊断灵敏度、特异度、准确度,值得在临床推广实践。

参考文献

[1] Yang E, Wang F, Xu Y, *et al.* A lentiviral vector-based therapeutic vaccine encoding Ag85B-Rv3425 potently increases resistance to acute tuberculosis infection, in mice[J]. *Aeta Biochim Biophys Sin*, 2015, 47(8):588-596.

[2] 任甜甜,刘翔. 结核感染 T 细胞斑点试验检测对老年活动性肺结核的诊断价值[J]. *河北医学*, 2017, 23(4):623-626.

[3] Carreras FJ, Aranda CJ, Porcel D, *et al.* Expression of glucose transporters in the prelaminar region of the optic-nerve head of the pig as determined by immunolabeling and tissue culture[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):1008-1009.

[4] 吴琼,王堃,丘世颀,等. T 细胞斑点试验在结核感染诊断中的

临床应用[J]. *中国医师杂志*, 2018, 20(1):87-91.

[5] 中华医学会. 临床诊疗指南:结核病分册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005.

[6] Lunte K, Cordierl-Lassalle T, Keravec J. Reducing the price of treatment for multidrug resistant tuberculosis through the Global Drug Facility[J]. *Bull World Health Organ*, 2015, 93(4):279-282.

[7] Yu SN, Jung J, Kim YK, *et al.* Diagnostic usefulness of IFN-Gamma releasing assays compared with conventional tests in patients with disseminated tuberculosis[J]. *Med (Baltimore)*, 2015, 94(28):e1094.

[8] 蒋瑜,吴婷. 结核感染 T 细胞斑点试验及抗结核抗体检测在结核诊断中的应用价值评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(16):2234-2236.

[9] 符艳,蒋正华. 结核免疫斑点试验与结核菌素试验在活动性结核病诊断中的优越性对比[J]. *中国医刊*, 2015, 50(8):54-57.

[10] 任斐,岳英,苗风济,等. γ -干扰素释放试验对活动性肺结核的诊断价值[J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(3):252-255.

[11] 孟苏凯,吴振萍,张玉华,等. 血清结核抗体检测在结核病临床诊断中的价值[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(22):3858-3860.

[12] 施瑞洁,刘文康,范云,等. T-SPOT. TB 在肺结核早期诊断中的应用研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2017, 32(2):60-63.

[13] 夏青,桂淑玉,韩君. 结核感染 T 细胞斑点试验在结核病诊断中的价值及影响因素[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(20):3469-3473.

[14] 宋瑞红,沈魏,鲁立文. 结核感染 T 细胞斑点试验在肺结核和肺外结核诊断中的价值[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(1):157-161.

[15] 李曙光,李莉,张修磊. 酶联免疫斑点试验在菌(涂)阴肺结核辅助诊断中的价值 - Meta 分析[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(3):515-519.

[16] 梁艳,王兰,张翠英,等. 两种 γ 干扰素释放试验及 PPD 试验结果在结核感染诊断中的比较[J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(7):740-747.

(收稿日期:2020-03-15)

学术编辑:张龙举)