

· 论著 ·

胸水结核感染 T 细胞斑点试验联合腺苷脱氨酶在结核性胸膜炎诊断中的价值

金灵肖¹ 金妙玲² 茅佳梁¹ 张双丽¹ 赵旭宏¹ 黄海珍¹ 洪江浩¹ 徐凯进³¹浙江省浦江县人民医院感染科,浙江金华 322200; ²浙江省浦江县人民医院检验科,浙江金华 322200; ³浙江大学医学院附属第一医院感染病中心 传染病诊治国家重点实验室,杭州 310003

通信作者:金灵肖,Email:jinlingxiao8@126.com

【摘要】 目的 探讨胸水结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)联合腺苷脱氨酶(ADA)在结核性胸膜炎中的诊断价值。方法 收集 2018 年 1 月至 2019 年 12 月浦江县人民医院及浙江大学第一附属医院住院治疗的 108 例胸腔积液患者,其中结核性胸腔积液(结核组)72 例,非结核性胸腔积液(非结核组)36 例,所有患者行外周血 T-SPOT.TB、胸水 T-SPOT.TB、胸水 ADA、胸水常规、生化指标检测,评估平行或联合诊断价值。结果 结核组胸水 ADA 水平为(54.7±27.4) U/L,显著高于非结核组的(11.6±8.3) U/L,差异有统计学意义($t=9.21, P<0.05$)。胸水 T-SPOT.TB、外周血 T-SPOT.TB、ADA 单项检测对结核性胸膜炎诊断灵敏度分别是 97.2%、93.0%、86.1%,特异性分别为 91.7%、80.6%、63.9%;胸水 T-SPOT.TB、血 T-SPOT.TB、ADA 平行联合诊断灵敏度更高,达 98.6%;三种方法联合检测特异性高达 94.0%,胸水 T-SPOT.TB 联合 ADA 检测诊断结核性胸特异性 94.0%。结论 胸水 T-SPOT.TB 试验对结核性胸膜炎诊断价值高,联合 ADA 检测可提高结核性胸膜炎的诊断率。

【关键词】 腺苷脱氨酶;结核感染 T 细胞斑点试验;结核性胸膜炎;联合诊断

基金项目:“十三五”国家科技重大专项(2017ZX10105001);金华市科技局课题(2018A453969)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200617-00199

Diagnostic value of hydrothorax T-cell spot test combined with adenosine deaminase for tuberculous pleurisy

Jin Lingxiao¹, Jin Miaolin², Mao Jialiang¹, Zhang Xuangli¹, Zhao Xuhong¹, Huang Haizhen¹, Hong Jianghao¹, Xu Kaijin³¹Department of Infectious Diseases, Pujiang Hospital, Jinhua 322200, Zhejiang, China; ²Clinical Laboratory, Pujiang Hospital, Jinhua 322200, Zhejiang, China; ³State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

Corresponding author: Jin Lingxiao, Email:jinlingxiao8@126.com

【Abstract】 **Objective** To explore the application value of T-cell spot test (T-SPOT.TB) combined with adenosine deaminase (ADA) in hydrothorax in the diagnosis of tuberculous pleurisy. **Methods** Totally 108 patients with pleural effusion in Pujiang Hospital and the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine from January 2018 to December 2019 were recruited. In these patients, 72 had tuberculous pleurisy (tuberculous group) and 36 had non-tuberculous pleurisy (non-tuberculous group). Peripheral blood T-SPOT.TB, T-SPOT.TB of hydrothorax, adenosine deaminase (ADA) of hydrothorax, routine test and biochemical indexes of hydrothorax were performed on all patients. The diagnostic values of parallel and serial combined tests were evaluated. **Results** The level of ADA in tuberculous group was (54.7±27.4) U/L, which was significantly higher than that of (11.6±8.3) U/L in non-tuberculous group ($t=9.21, P<0.05$). The sensitivities of T-SPOT.TB in hydrothorax, T-SPOT.TB in peripheral blood and ADA to the diagnosis of tuberculous pleurisy were 97.2%, 93.0% and 86.1%, respectively, and the specificities were 91.7%, 80.6% and 63.9%, respectively. In the three tests, the sensitivity of parallel combined testing was up to 98.6%, the specificity of serial combined examination was 94.0%. The specificity of hydrothorax T-SPOT.TB combined with ADA in diagnosis of tuberculous pleurisy was 94.0%. **Conclusions** The T-SPOT.TB of pleural effusion is of high value in the diagnosis of tuberculous pleurisy, and the combination with ADA test can improve the diagnostic accuracy of tuberculous pleurisy.

【Key words】 Adenosine deaminase; T-cell spot test; Tuberculous pleurisy; Combined diagnosis

Fund program: National Science and Technology Major Project of China during the 13th Five-Year Plan Period(2017ZX10105001); Project of Jinhua Science and Technology Bureau(2018A453969)
DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20200617-00199

WHO 公布的数据显示,中国 2018 年结核病患者数占全球总数的 9%,居世界第 2 位^[1]。结核性胸膜炎是结核病的一种特殊类型,是引起胸腔积液最常见的原因,约占全部胸腔积液的 50%^[2]。胸水涂片找结核杆菌、结核杆菌培养等方法阳性率低,难以准确指导临床诊疗^[3-4],临床亟需一种便捷、快速、实用的诊断方法。目前外周血结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)已广泛应用于结核病诊断,但用胸水 T-SPOT.TB 检测来诊断结核性胸膜炎的研究相对较少。本研究收集 108 例胸腔积液患者,行外周血 T-SPOT.TB、胸水 T-SPOT.TB 检测结合胸水的其他指标检查,探讨在诊断结核性胸膜炎的临床应用价值。

对象与方法

一、研究对象

选择 2018 年 1 月至 2019 年 12 月浦江县人民医院及浙江大学第一附属医院感染疾病科住院治疗的 108 例胸腔积液患者,确诊或临床诊断结核性胸腔积液患者 72 例为结核组,结核性胸腔积液诊断标准参照中华人民共和国卫生行业标准 WS 288-2017。随机选择同期住院治疗合并非结核性胸腔积液的患者 36 例为非结核组。排除标准:妊娠期或哺乳期妇女,合并其他传染性疾病如艾滋病、麻疹和伤寒等,除外近 1 周出现心衰、烧伤、外伤和手术等应激情况者。本研究经医院伦理委员会批准(伦理审批号:201803),所有患者自愿参与本研究并签署知情同意书。

二、方法

1. T-SPOT.TB 测定

T-SPOT.TB 试剂盒由英国 Oxord Immunotec 公司生产,上海复星公司提供。操作方法:用无菌密闭容器采集新鲜 50 mL 胸水,加入一定比例的肝素抗凝并立即混匀,取 50 mL 样本于 5 个 10 mL 离心管内,离心 5 min,吸出沉淀细胞,加 1640 培养液至 10 mL

重悬细胞,随后过程与使用外周血样本的检测相同。取该混悬液加到 4 mL 的 Ficoll(淋巴细胞分离液)液面上,离心分离出单个核细胞(PFMC)和外周血单核细胞(PBMC)。经离心洗涤 2 次后,用 500 UL AIMV 培养液重悬单个核细胞,取 10 UL 重悬液与台盼蓝 2 倍稀释用显微镜计数细胞,用 AIMV 培养液将浓度调到 $2.5 \times 10^6/\text{mL}$ 。斑点技术:在已包被抗 IFN γ 单抗的 96 孔板上,分别加入 50 UL 细胞培养基作为空白对照组,50 UL 植物血凝素作为阳性对照,以 50 UL 结核分枝杆菌特异性早期分泌靶抗原 6 (ESAT-6)和培养滤液蛋白 10 (CFP-10)作为刺激原。把 96 孔板放在 37 °C 孵箱培养 16~20 h 后,用 PBS 液洗板 4 次,加入碱性磷酸酶标记的二抗,在 2~8 °C 下孵育 1 h,孵育后再用 PBS 液洗板 4 次,最后每孔加入显色底物 BCIP/NBTPLUS,室温中避光静置 7 min 后去离子水终止反应,开始计数斑点形成细胞数。T-SPOT.TB 阳性结果判断标准:①如阴性对照孔斑点数 < 6 个,检测孔斑点数减去阴性对照孔斑点数 > 6 个;②如阴性对照孔斑点数 > 6 个,检测孔斑点数必须达到阴性对照孔斑点数的 2 倍以上。

2. 胸水腺苷脱氨酶(ADA)检测

选用深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产的试剂及全自动生化分析仪进行胸水 ADA 检测,ADA > 25 U/L 作为诊断临界值。

3. 其他指标检测

选用 OLYMPUS 显微镜和牛鲍计数板计数进行胸水常规项目检测。选用西门子检测试剂和全自动生化分析仪进行总蛋白、葡萄糖、乳酸脱氢酶等胸水生化指标的检测。

三、统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;计数资料采用例数和率表示,两组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。平行联合试验只要

有一项检测结果为阳性就判为阳性,系列联合试验只有全部检测结果阳性才判为阳性。

结 果

一、基本情况

72 例结核组患者中,男 30 例,女 42 例,年龄(35.1±24.3)岁,范围在 17~73 岁;36 例非结核组患者中,男 15 例,女 21 例,年龄(38.3±23.2)岁,范围在 22~77 岁。肺癌伴胸膜转移 27 例,卵巢癌伴胸膜转移 4 例,肺炎合并胸腔积液 2 例,肝硬化伴肝性胸水 3 例。两组年龄、性别、既往在结核病史、卡介苗接种史及潜在合并症等方面比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

二、胸水常规、生化指标结果

结果显示,两组患者在胸水白细胞数、葡萄糖、总蛋白、乳酸脱氢酶等方面差异无统计学意义(P 均 >0.05),但结核组胸水 ADA 水平为(54.7±27.4) U/L,显著高于非结核组的(11.6±8.3) U/L,差异有统计学意义($t=9.21, P<0.05$)。

三、胸水 T-SPOT.TB、ADA、外周血 T-SPOT.TB 单独检测结果

72 例结核性胸腔积液患者中,胸水 T-SPOT.TB、外周血 T-SPOT.TB 和 ADA 检出阳性患者数分别为 70、67 和 62 例,三种方法的灵敏度分别为 97.2%、93.1%和 86.1%;36 例非结核性胸腔积液患者中,胸水 T-SPOT.TB、外周血 T-SPOT.TB 和 ADA 检出阴性患者数分别为 33、29 和 23 例,三种方法的特异性分别为 91.7%、80.6%和 63.9%。见表 1。

表 2 胸水 T-SPOT.TB、外周血 T-SPOT.TB 试验、ADA 联合检测诊断价值(%)

试验方法	灵敏度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
平行联合试验				
胸水 T-SPOT.TB 或 ADA	98.1	88.0	92.0	91.0
外周血 T-SPOT.TB 或 ADA	94.5	71.0	83.0	84.0
胸水 T-SPOT.TB 或 外周血 T-SPOT.TB	98.1	71.0	92.2	91.1
胸水 T-SPOT.TB 或 ADA 或外周血 T-SPOT.TB	98.6	57.0	78.0	93.0
系列联合试验				
胸水 T-SPOT.TB 和 ADA	84.0	94.0	97.0	77.0
外周血 T-SPOT.TB 和 ADA	74.0	86.0	92.0	79.0
胸水 T-SPOT.TB 和外周血 T-SPOT.TB	82.0	93.1	93.0	88.0
胸水 T-SPOT.TB 和 ADA 和外周血 T-SPOT.TB	63.0	94.0	98.0	92.0

注:T-SPOT.TB:结核感染 T 细胞斑点试验;ADA:腺苷脱氨酶

表 1 胸水 T-SPOT.TB、外周血 T-SPOT.TB 和胸水 ADA 对结核性胸膜炎的诊断价值(%)

诊断方法	灵敏度	特异性	阳性预测值	阴性预测值
胸水 T-SPOT.TB	97.2	91.7	96.5	94.5
外周血 T-SPOT.TB	93.1	80.6	91.3	87.1
胸水 ADA	86.1	63.9	85.2	76.7

注:T-SPOT.TB:结核感染 T 细胞斑点试验;ADA:腺苷脱氨酶

四、不同联合方法检测在结核性胸腔积液的诊断价值

胸水 T-SPOT.TB 试验、ADA 和外周血 T-SPOT.TB 试验平行联合检测的敏感性更高达 98.6%,平行联合诊断结核性胸膜炎效果好。胸水 T-SPOT.TB 和 ADA 和外周血 T-SPOT.TB 系列联合检测的特异性高于平行联合检测,高达 94.0%。详见表 2。

讨 论

结核性胸膜炎是一种由结核分枝杆菌及其代谢产物进入高敏状态的胸膜腔而引起的胸膜渗出性炎症,目前常用人型结核菌素试验(PPD)、胸水生化检查、胸水病原学检查(涂片染色、培养)及胸膜活检病理组织等传统检测方法来诊断,这些方法阳性率低或者胸膜活检有创等问题不利于临床早期诊治^[5],临床需寻找一种便捷、有效、经济的检测方法。

ADA 作为嘌呤核苷代谢的重要酶类,主要存在淋巴细胞中,当结核分枝杆菌侵及胸膜,机体启动以淋巴细胞为主的细胞免疫调节机制,淋巴细胞活性增高,所以 ADA 在结核性胸腔积液中通常且较高^[6]。ADA 是目前诊断结核性胸膜炎的一种常规较

为理想的检测项目,陈敏等^[3]报道显示 ADA 诊断结核性胸膜炎的敏感性为 80.5%,本文胸水 ADA 单项检测阳性率 86.1%,略高于报道,这与 ADA 的临界值偏低(25 U/L)有关,另外胸水 ADA 的敏感性可能与炎症早期或机体免疫功能低下相关。

T-SPOT.TB 技术是一种检测结核效应 T 淋巴细胞因子的技术,具有较高的灵敏度和特异性^[7]。鉴于结核抗原特异度 T 细胞可能在病变部位趋向于集中,病变处的效应 T 细胞数量与外周血比较可增高 10~15 倍^[8],胸水 T-SPOT.TB 检测在诊断结核性胸膜炎灵敏度及特异性均高于外周血 T-SPOT.TB 的检测结果^[9-10]。本研究采用 T-SPOT.TB 技术对胸腔积液中结核分枝杆菌感染进行检测,结果发现胸水 T-SPOT.TB 灵敏度为 97.2%,特异性为 91.7%,比北京协和医院的结果(灵敏度 91.9%,特异性 87.1%)略高^[11]。本文应用胸水 T-SPOT.TB 和 ADA、外周血 T-SPOT.TB 平行联合诊断发现灵敏度可高达 98%,且灵敏度高于任何单项检测方法;同样胸水 T-SPOT.TB 和 ADA 联合检测特异性增高,亦高于任何单项检测方法,这与 Xu 等^[12]结果相似,表明采用上述方法可以减少漏诊、误诊。

综上所述,采用胸水 T-SPOT.TB 试验有助于提高结核性胸膜炎的诊断率,如联合胸水 ADA 检测可进一步提高结核性胸膜炎的诊断率,值得基层临床推广。但本研究胸水 T-SPOT.TB 采用了外周血 T-SPOT.TB 界值,且 ADA 与年龄是否有关也未深入研究,尚需进一步的大样本研究进行深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017:World Health Organization [EB/OL]. [2019-09-12]. www.who.int/tb/publications/global-report/en/.
 [2] 陈志飞. 腺苷脱氨酶联合 TB-IGRA 在结核性胸膜炎诊断中的应用价值[J].中国医师杂志,2017,19(1):111-114. DOI:10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2017.01.034.
 Chen ZF. Application value of adenosine deaminase combined with TB-IGRA in the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. J Chin Phys, 2017,19(1):111-114. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2017.01.034.
 [3] 陈敏,陈捷,宋大伟. 三种检测技术联用在结核性胸膜炎诊断中

的应用价值 [J]. 中国防痨杂志,2016, 38 (8): 634-638. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2016.08.007.
 Chen M, Chen J, Song DW. Value of combined use of three tests in diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. Chin J Antitubercul, 2016, 38(8): 634-638. DOI: 10.3969/j.issn.1000-6621.2016.08.007.
 [4] 李美忠,邱振纲,张明霞,等. 结核病患者体内抗原特异性多功能辅助 T 细胞 1 的监测及分析 [J]. 结核病与肺部健康杂志, 2014,3(1):11-14. DOI:10.3969/j.issn.2095-3755.2014.01.003.
 Li MZ, Qiu ZG, Zhang MX, et al. Frequency and clinical significance of antigen-specific multifunctional Th1 cells in tuberculosis patients [J]. Journal of Tuberculosis and Lung Health, 2014,3(1):11-14. DOI:10.3969/j.issn.2095-3755.2014.01.003.
 [5] 王瑛,徐唯桀,乐军,等. 6 项指标联合检测在结核性与肺癌胸腔积液鉴别诊断中价值[J].临床肺科杂志,2015,20(3):389-391. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2015.03.001.
 Wang Y, Xu WJ, Le J, et al. Differential diagnosis value of 6 indexes in tuberculous and malignant pleural effusion [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2015,20 (3):389-391. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2015.03.001.
 [6] Pandie S, Peter JG, Kerbelker ZS, et al. Diagnostic accuracy of quantitative PCR (Xpert MTB/RIF) for tuberculous pericarditis compared to adenosine deaminase and unstimulated interferon-γ in a high burden setting: a prospective study [J]. BMC Med, 2014,12:101. DOI: 10.1186/1741-7015-12-101.
 [7] Subramani R, Datta M, Swaminathan S. Does effect of BCG vaccine decrease with time since vaccination and increase tuberculin skin test reaction ?[J]. Indian J Tuberc, 2015,62 (4): 226-229. DOI: 10.1016/j.ijtb.2015.08.002.
 [8] 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. DOI: 10.7326/0003-4819-149-3-200808050-00241.
 [9] 乔帅. 酶联免疫吸附试验诊断结核病的临床检测意义 [J]. 世界最新医学信息文摘,2016,16 (13): 132. DOI:10.3969/j.issn.1671-3141.2016.13.100.
 Qiao S. Value of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of tuberculosis [J]. World Latest Medicine Information, 2016,16(13): 132. DOI:10.3969/j.issn.1671-3141.2016.13.100.
 [10] Kim MC, Kim SM, Lee SO, et al. A diagnostic algorithm for tuberculous pleurisy using the ELISPOT assay on peripheral blood and pleural effusion [J]. Infect Dis (Lond), 2016,48 (9):688-694. DOI: 10.1080/23744235.2016.1183816.
 [11] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0085030.
 [12] Xu HY, Li CY, Su SS, et al. Diagnosis of tuberculous pleurisy with combination of adenosine deaminase and interferon-γ immunospot assay in a tuberculosis-endemic population: A prospective cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2017,96(47):e8412. DOI: 10.1097/MD.00000000000008412.