

论著 • 临床研究

酶联免疫斑点法联合肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测在涂阴肺结核的诊断价值*

段月庭¹, 毕科研^{1△}, 解金磊², 蔡向敬¹

(1. 聊城市传染病医院结核科, 山东聊城 252000; 2. 聊城市卫生和计划生育委员会, 山东聊城 252000)

摘要:目的 探讨酶联免疫斑点法联合肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测在涂阴肺结核的诊断价值。方法 选择 2015 年 8 月至 2016 年 8 月该院收治的 68 例涂阴肺结核患者作为研究对象, 采用酶联免疫斑点法及肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测, 将酶联免疫斑点法及结核菌 Xpert 检测结果与痰培养结果相比, 分析其对涂阴肺结核的诊断价值。**结果** 肺结核患者临床表现以夜间盗汗、发热、咳嗽、咳痰为主; X 射线、CT 检查结果以斑片影云絮影多见。联合检查对于不同类型肺结核的诊断正确率明显高于单独采用酶联免疫斑点法或结核菌 Xpert 检测, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。酶联免疫斑点法诊断的灵敏度为 88.46%, 特异度为 69.05%, 准确度为 76.47%; 结核菌 Xpert 检测诊断的灵敏度为 80.77%, 特异度为 52.38%, 准确度为 63.23%; 联合检测诊断的灵敏度为 92.30%, 特异度为 78.57%, 准确度为 83.82%; 联合检测对诊断涂阴肺结核的灵敏度、特异度及准确度均有显著提高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 酶联免疫斑点法联合肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测对诊断涂阴肺结核具有重要价值, 是一种简便、快速、高效的检查方法。

关键词: 酶联免疫斑点法; 肺泡灌洗; Xpert MTB/RIF; 涂阴肺结核

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.12.014 **中图法分类号:** R446.5; R521

文章编号: 1673-4130(2018)12-1460-04 **文献标识码:** A

Diagnostic value of enzyme-linked immunospot assay combined with bronchoalveolar lavage fluid tuberculosis Xpert detection in smear negative pulmonary tuberculosis*

DUAN Yueying¹, BI Keyan^{1△}, XIE Jinlei², CAI Xiangjing¹

(1. Respiratory Medicine, Liaocheng Infectious Disease Hospital, Liaocheng, Shandong 252000, China;

2. Health and Family Planning Commission of Liaocheng, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the diagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay combined with bronchoalveolar lavage fluid tuberculosis Xpert detection in smear negative pulmonary tuberculosis. **Methods** From August 2015 to August 2016, 68 cases of smear negative pulmonary tuberculosis, admitted in the hospital, were enrolled in the study. Enzyme-linked immunosorbent assay and bronchoalveolar lavage fluid tuberculosis Xpert detection were used in the study. The results of enzyme-linked immunosorbent assay and tuberculosis sXpert detection were compared with sputum culture results, and their diagnostic values for smear negative pulmonary tuberculosis were analyzed. **Results** The clinical manifestations of pulmonary tuberculosis were mainly nocturnal sweating, fever, cough and expectoration. The results of X-ray and CT examinations showed that the lesions were mostly patchy or in cloudy opacity. The diagnostic accuracy of the combined examination for different types of pulmonary tuberculosis was significantly higher than single detection of enzyme-linked immunosorbent assay or tuberculosis Xpert detection, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assay was 88.46%, the specificity was 69.05%, and the accuracy was 76.47%; the sensitivity of tuberculosis Xpert detection was 80.77%, the specificity was 52.38%, and the accuracy was 63.23%; the sensitivity of the combined detection was 92.30%, the specificity was 78.57%, and the accuracy was 83.82%; the sensitivity, the specificity and the accuracy of the combined detection for diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The enzyme-linked immunosorbent assay

* 基金项目: 山东省统计科研重点基金资助项目(2014-227)。

作者简介: 段月庭, 男, 主治医师, 主要从事结核病的诊断及治疗方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: lcbky@126.com。

本文引用格式: 段月庭, 毕科研, 解金磊, 等. 酶联免疫斑点法联合肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测在涂阴肺结核的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(12): 1460-1462.

combined with bronchoalveolar lavage fluid tuberculosis Xpert detection has important value in the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis. It is a simple, rapid and effective method of examination.

Key words: enzyme-linked immunosorbent assay; alveolar wash; Xpert MTB/RIF; smear negative pulmonary tuberculosis

结核病是影响人类健康的慢性疾病之一,我国结核发病率居世界前列,活动性肺结核患者数量居世界第 2 位^[1]。结核病早期无特异性临床表现,发现率较低,目前研究多集中于涂阳患者的早期发现、治疗,以及了解涂阳肺结核患者的临床表现,但是近年来涂阴肺结核相关研究引起临床上的重视。涂阴肺结核是指有肺结核临床症状或影像学检查有异常表现,至少有 3 次痰涂片镜检抗酸杆菌阴性^[2]。临床中确诊肺结核主要结合临床表现、影像学、细菌涂片、免疫及培养等,但是对于涂阴肺结核,其临床症状多样、轻重不一,易与其他呼吸系统疾病相混淆,若采用传统方法进行诊断,阳性率降低、耗时较长^[3],因此,寻找快速、高效、准确的诊断方法具有重要临床意义。近年来,纤维支气管镜检查成为肺部疾病重要的辅助检查方法。有学者提出,通过肺泡灌洗进行 SAT-TB、Xpert 检测,对诊断涂阴肺结核具有重要价值^[4]。因此,本研究探讨酶联免疫斑点法联合肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测在涂阴肺结核的诊断价值,旨在提高涂阴肺结核的诊断正确率及确诊速度。具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究经过本院道德伦理委员会批准,获得患者及家属同意,并且签订知情同意书。纳入标准:(1)符合《中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)》^[5]中的涂阴肺结核诊断标准;(2)患者未伴有严重心功能不全。排除标准:(1)近期发生心肌梗死者;(2)伴有大量咯血者。依据纳入及排除标准选取 2015 年 8 月至 2016 年 8 月本院收治的 68 例涂阴肺结核患者作为研究对象,其中男 46 例,女 22 例;年龄 21~73 岁,平均(54.24±14.87)岁。

1.2 方法

1.2.1 肺泡灌洗 入组患者均采用奥林巴斯纤维支气管镜检查,依据患者胸部 CT 或 X 射线检查结果,选择病变支气管作为灌洗部位,将 10~20 mL 生理盐水通过支气管镜灌入病变支气管中,负压吸引回收灌洗液,重复 2~3 次,收集约 20 mL 灌洗液至无菌瓶内,送实验室检查。

1.2.2 结核菌 Xpert 检测 将肺泡灌洗液(约 5 mL)与含有氢氧化钠(NaOH)及异丙醇的处理液按照 2:1 均匀混合,室温下静置 15 min,将混合液转移至多室塑料反应盒中,采用 Gene Xpert 仪(美国 Cepheid 公司)进行检测,120 min 后记录结果。

1.2.3 酶联免疫斑点法 取入组患者外周血及肺泡灌洗液各 4 mL,分离得到单个核细胞,细胞浓度调节为 2.0×10^6 个/mL;阴性对照孔内加入完全细胞培养

液 50 μ L,阳性对照孔内加入植物血凝素 50 μ L,于测试孔内加入相对分子质量为 10×10^3 的培养滤过蛋白、 6×10^3 的早期分泌靶向抗原融合蛋白 50 μ L。分别在上述各孔内加 100 μ L 密度为 2.0×10^5 个单个核细胞悬液,将微孔滤膜板置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 孵箱中孵育 20 h,弃上清,用 PBS 洗 4 次后,向每孔加入 50 μ L 稀释的 IFN- γ 检测抗体,于 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h;用 PBS 洗板后,加入 50 μ L 链亲合素-碱性磷酸酶,于室温下孵育 2 h;用 PBS 洗板后,每孔加入 50 μ L 新鲜配制的 BICP/NBT 底物,显色 15 min;当底板显示紫色斑点,用蒸馏水洗板中止反应。每 1 个点代表 1 个分泌 γ -干扰素(IFN- γ)的 T 细胞,应用 CTL 公司酶联斑点分析仪计数着色的斑点。当阴性对照孔点数 <13,检测孔点数减去阴性对照孔点数 ≥ 13 ,可判断所检测标本为阳性;如果阴性对照孔点数 ≥ 13 ,检测孔点数为阴性对照孔的 2 倍,可判断所检测标本为阳性。

1.3 观察指标 (1)记录入组患者主要临床表现(包括发热、咳嗽、咳痰、痰中带血、呼吸困难及夜间盗汗)及 X 射线、CT 检查结果(如结节影、斑片影、云絮影、空洞影及胸腔积液)。(2)记录患者肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测及酶联免疫斑点法结果,并计算敏感度、特异度、准确度、阳性预测值及阴性预测值。其中敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;特异度=真阴性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;准确度=(真阳性例数+真阴性例数)/总例数 $\times 100\%$;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;阴性预测值=真阴性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 应用 SPSS15.5 软件包进行数据处理,计数资料采用 $[n(\%)]$ 表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床表现、X 射线及 CT 检查结果比较 68 例肺结核患者中,2 例为原发性肺结核,66 例为继发性肺结核,13 例合并肺外结核。入组患者临床表现以夜间盗汗、发热、咳嗽、咳痰为主;X 射线、CT 检查结果以斑片影云絮影多见。见表 1。

2.2 两种检查方法对不同类型涂阴肺结核的诊断结果 联合检查对于不同类型肺结核的诊断正确率明显高于单独采用酶联免疫斑点法或结核菌 Xpert 检测,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 两种检查方法诊断涂阴肺结核的价值分析 酶联免疫斑点法诊断的灵敏度为 88.46%,特异度为

69.05%，准确度为 76.47%；结核菌 Xpert 检测诊断的灵敏度为 80.77%，特异度为 52.38%，准确度为 63.23%；联合检测诊断的灵敏度为 92.30%，特异度为 78.57%，准确度为 83.82%；联合检测对诊断涂阴肺结核的灵敏度、特异度及准确度均有显著提高，差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 1 患者临床表现、X 射线及 CT 检查结果比较		
项目	<i>n</i>	占比(%)
临床表现		
发热	28	41.18
咳嗽、咳痰	40	58.82
痰中带血	9	13.24
呼吸困难	2	2.94
夜间盗汗	68	100.00
X 射线、CT 检查		
斑片影、云絮影	44	64.71
空洞影	15	22.06
结节影	14	20.59
胸腔积液	7	10.29

表 2 两种检查方法对不同类型涂阴肺结核的诊断结果(<i>n</i>)			
方法	原发性肺结核	继发性肺结核	合计
酶联免疫斑点法	1	50	51
结核菌 Xpert 检测	1	41	42
联合检测	2	54	56 ^{ab}
痰培养	2	66	68

注：与酶联免疫斑点法比较，^a $P<0.05$ ；与结核菌 Xpert 检测比较，^a $P<0.05$

表 3 两种检查方法诊断涂阴肺结核的价值分析						
检查方法	灵敏度 (%)	特异度 (%)	Youden 指数	准确度 (%)	阳性似 然比 (%)	阴性似 然比 (%)
酶联免疫斑点法	88.46	69.05	0.34	76.47	63.89	90.63
结核菌 Xpert 检测	80.77	52.38	0.40	63.23	51.22	81.48
联合检测	92.30 ^{ab}	78.57 ^{ab}	0.59	83.82	72.73	94.28

注：与酶联免疫斑点法比较，^a $P<0.05$ ；与结核菌 Xpert 检测比较，^b $P<0.05$

3 讨 论

统计发现，我国结核病患者人群中，涂阴肺结核患者约占 85%，在结核病的防控中成为不可忽视的群体^[6]。从临床症状来看，涂阴肺结核患者多伴有咳嗽症状，而从单因素与多因素分析结果来看，咳嗽与肺结核无明显联系，这与涂阳肺结核患者明显不同；另外，涂阴肺结核患者可伴有盗汗、体质量下降、发热、乏力等症状^[7-8]。本研究结果显示，入组患者主要以肺结核患者临床表现(夜间盗汗、发热、咳嗽、咳痰)为主，缺乏典型表现，因而影响临床医生的判断。研究

发现，涂阴肺结核患者胸片表现不典型，缺乏特异性，多数缺乏涂阳肺结核的渗出、增生、钙化灶同时存在的多形态特征表现^[9]。本研究结果显示，X 射线、CT 检查结果以斑片影云絮影多见，同样缺乏特异性，因此，临床医师需综合患者病史、辅助检查等进行综合诊断，以提高诊断的正确率。

目前临床中诊断肺结核主要通过病原学检查，但是检测方法易受到标本获取、患者间断性排菌、结核菌数量级别等因素的影响，致敏感度较低，且该检测方法耗时较长，与临床结核病快速诊断的要求存在一定差距^[10]。近年来，一种以结核分枝杆菌 RD1 基因编码抗原 ESAT-6 和 CFP-10 肽段库为刺激原，应用酶联免疫斑点法诊断结核感染的新方法逐渐兴起，该方法检测的是单个核细胞中结核抗原特异性 T 细胞 IFN- γ 的分泌^[11-12]。结核杆菌 Xpert 检测是 2011 年世界卫生组织制定的对适应人群进行痰液的检测，而近来研究发现，纤维支气管镜检查获得的肺泡灌洗液中的抗酸杆菌涂片及培养阳性率高于痰液标本，可显著提高结核病诊断的敏感度^[13-14]。张海晴等^[15]研究通过 Xpert MTB/RIF 试剂盒对结核疑似患者进行诊断，将结果与痰涂片、培养及核扩增检测方法相比发现，对于涂阳标本中，Xpert MTB/RIF 的检出率为 98.2%；对于涂阴标本中，Xpert MTB/RIF 的检出率为 72.1%，若复检可提高检出率。本研究结果显示，联合检查对于不同类型肺结核的诊断正确率明显高于单独采用酶联免疫斑点法或结核菌 Xpert 检测。本研究还探讨联合检测对涂阴肺结核的诊断价值，结果显示诊断的灵敏度为 92.30%，特异度为 78.57%，准确度为 83.82%，提示联合检测对诊断涂阴肺结核的灵敏度、特异度及准确度均有显著提高；结果说明联合检测可准确、高效地协助临床医生进行诊断，缩短患者等待确诊时间，使患者能够得到及时治疗，改善预后。

综上所述，酶联免疫斑点法联合肺泡灌洗液结核菌 Xpert 检测对诊断涂阴肺结核具有重要价值，具有较高的灵敏度及特异度，为一种简便、快速、高效的检查方法，值得广泛应用于临床。

参考文献

[1] 孙晶. 调查分析结核病流行病学疫情现状及其控制对策[J]. 中国公共卫生, 2015, 30(A03): 67-68.

[2] 薛晓, 马艳, 刘二勇, 等. 涂阴肺结核患者的诊断与治疗研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(5): 526-530.

[3] ZHANG Z X, SNG L H, YONG Y, et al. Delays in diagnosis and treatment of pulmonary tuberculosis in AFB smear-negative patients with pneumonia[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2017, 21(5): 544-549.

[4] 高春景, 朱述阳. 支气管肺泡灌洗液行 Xpert MTB/RIF 检测对涂阴肺结核的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(12): 2192-2196.

(下转第 1466 页)

- in hypertension in diabetic and non-diabetic patients in Nigeria: a comparative study[J]. *Biomed Res*, 2016, 27(1):250-256.
- [4] ABBASI F, FELDMAN D, CAULFIELD M P, et al. Relationship among 25-hydroxyvitamin D concentrations, insulin action, and cardiovascular disease risk in patients with essential hypertension[J]. *Am J Hypertens*, 2015, 28(2): 266-272.
- [5] TALEBNEJAD M R, MOSALLAEI M, AZARPIRA N. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and homocysteine level in patients with pseudoexfoliation and pseudoexfoliation glaucoma in southern Iran[J]. *Iran Red Crescent Med J*, 2009, 11(4):445-449.
- [6] BUSHUEVA O, SOLODILOVA M, IVANOV V, et al. Gender-specific protective effect of the -463G>A polymorphism of myeloperoxidase gene against the risk of essential hypertension in Russians[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2015, 9(11):902-906.
- [7] DÖRR O, LIEBETRAU C, MÖLLMANN H, et al. Beneficial effects of renal sympathetic denervation on cardiovascular inflammation and remodeling in essential hypertension[J]. *Clin Res Cardiol*, 2015, 104(2):175-184.
- [8] LÍRIO L M, FORECHI LUDIMILA, ZANARDO T C, et al. Chronic fructose intake accelerates non-alcoholic fatty liver disease in the presence of essential hypertension[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(1):85-92.
- [9] TENTORI S, MESSAGGIO E, BRIONI E, et al. Endogenous ouabain and aldosterone are coelevated in the circulation of patients with essential hypertension[J]. *J Hypertens*, 2016, 34(10):2074-2080.
- [10] MALÇOK GÜREL Ö, BILGİÇ A, DEMİRÇELİK B, et al. The relationship between 25-hydroxyvitamin D levels and ambulatory arterial stiffness index in newly diagnosed and never-treated hypertensive patients [J]. *Blood Press Monit*, 2016, 21(1):49-53.
- [11] DOMARACKI P, SADLECKI P, ODROWAZ-SYPNIEWSKA G, et al. Serum 25(OH) vitamin D levels in Polish women during pregnancies complicated by hypertensive disorders and gestational diabetes[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10):1574-1577.
- [12] MARU L, VERMA M, JINSIWALE N. Homocysteine as predictive marker for Pregnancy-Induced Hypertension: a comparative study of homocysteine levels in normal versus patients of PIH and its complications[J]. *J Obstet Gynaecol India*, 2016, 66(Suppl 1):S167-171.
- [13] WANG B, LIN L, ZHAO C. Related factors of serum uric acid in patients with primary hypertension and hyperhomocysteinemia[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016, 38(3):312-316.
- [14] YANG W C, LU J J, YANG L, et al. Association of matrix metalloproteinase-9 gene -1562C/T polymorphism with essential hypertension: a systematic review and Meta-Analysis article [J]. *Iran J Public Health*, 2015, 44(11):1445-1452.
- [15] LEKVA T, MICHELSEN A E, BOLLERSLEV J A, et al. Low circulating pentraxin 3 levels in pregnancy is associated with gestational diabetes and increased apoB/apoA ratio: a 5-year follow-up study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2016, 15(1):23-26.

(收稿日期:2018-01-08 修回日期:2018-03-13)

(上接第 1462 页)

- [5] 肖东楼, 赵明刚, 王宇, 等. 中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版)[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009:27-29.
- [6] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. *中国防痨杂志*, 2012, 34(8):485-508.
- [7] 杜正新, 何佩贤. 涂阴与涂阳肺结核患者发现方式及发现初期临床症状和体征的对比分析[J]. *中国防痨杂志*, 2016, 38(11):940-944.
- [8] 黄飞, 刘二勇, 夏愔愔, 等. 2005-2014 年全国涂阴肺结核报告发病与死亡现状分析[J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(5):473-477.
- [9] 张晓萍, 马红霞, 程小飞, 等. 涂阴老年不典型肺结核的多种 CT 影像表现[J]. *临床肺科杂志*, 2015(8):1484-1486.
- [10] LAI D, KOIZIA L, MANEK N, et al. Utility of bronchoalveolar lavage in diagnosis of sputum/smear-negative pulmonary tuberculosis in a non-endemic area with a high proportion of HIV positive patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(5):375-383.
- [11] 高东花, 陈栋军. 研究酶联免疫斑点法检测在涂阴肺结核患者的诊断价值[J]. *中国医药科学*, 2017, 7(13):104-106.
- [12] 刘琳, 吴雪琼, 王兰, 等. 酶联免疫斑点法检测在涂阴肺结核患者的诊断价值[J]. *北京医学*, 2015, 37(3):220-223.
- [13] PANG YU, WANG YUFENG, ZHAO SHUNYING, et al. Evaluation of the xpert MTB/RIF assay in gastric lavage aspirates for diagnosis of smear-negative childhood pulmonary tuberculosis[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(10):1047-1051.
- [14] YIN Q Q, JIAO W W, HAN R, et al. Rapid diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis by Xpert MTB/RIF assay using bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:310194.
- [15] 张海晴, 刘成永, 周冬青, 等. GeneXpert MTB/RIF 系统在结核性胸膜炎快速诊断中应用价值[J]. *北京医学*, 2016, 38(7):739-741.

(收稿日期:2018-01-12 修回日期:2018-03-17)