

## T-SPOT 中 TBAG/PHA 比值在结核病诊断中的应用价值

杨 扬, 向 瑜<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属第一医院检验科, 重庆 400016)

**摘要:**目的 探讨结核分枝杆菌特异性抗原(TBAG)/植物凝集素(PHA)比值诊断活动性结核病(ATB)、潜伏性结核病(LTBI)及陈旧性结核病(OTB)的应用价值。方法 选取2016年10月至2017年6月该院收治的住院且T细胞斑点试验(T-SPOT)检测均为阳性的结核病患者191例,其中确诊为ATB患者101例,LTBI患者84例,OTB患者6例。采用T-SPOT试验对2种TBAG进行检测,包括早期分泌靶抗原-6(ESAT-6)和培养滤液蛋白-10(CFP-10)。统计ESAT-6、CFP-10和PHA形成的斑点数(sfc),计算ESAT-6/PHA比值和CFP-10/PHA比值,其中比值大者定义为TBAG/PHA比值并纳入统计分析。结果 ATB组患者PHA sfc显著低于LTBI组和OTB组,TBAG/PHA比值显著高于LTBI组和OTB组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );以TBAG/PHA比值为0.2798作为区分ATB和LTBI的临界值,灵敏度和特异性分别达82.00%和91.67%。结论 TBAG/PHA比值可用于诊断ATB,且在鉴别ATB和LTBI方面具有较好的临床应用价值。

**关键词:**分枝杆菌,结核; 抗原; 植物凝集素类; 结核; T细胞斑点试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.020

中图法分类号:R52;R446.1

文章编号:1673-4130(2018)23-2926-04

文献标识码:A

## The application of TBAG/PHA ratio in T-SPOT in the diagnosis of tuberculosis

YANG Yang, XIANG Yu<sup>△</sup>

(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**Abstract: Objective** To explore the diagnostic value of mycobacterium tuberculosis specific antigen (TBAG)/phytagglutinin (PHA) ratio in active tuberculosis (ATB), latent tuberculosis (LTBI) and old tuberculosis (OTB). **Methods** 191 tuberculosis patients admitted to our hospital from October 2016 to June 2017 with positive T-SPOT test were selected. Among them, 101 patients were diagnosed as ATB, 84 patients with LTBI and 6 patients with OTB. Two kinds of TBAG were detected by T-SPOT test, including early secretion target antigen-6 (ESAT-6) and culture filtrate protein-10 (CFP-10). Spot counts (sfc) formed by ESAT-6, CFP-10 and PHA were counted. ESAT-6/PHA ratio and CFP-10/PHA ratio were calculated. The larger ratio was defined as TBAG/PHA ratio and included in the statistical analysis. **Results** In the ATB group, sfc of PHA was decreased significantly comparing to LTBI group and OTB group. The TBAG/PHA ratio in ATB group was significantly higher than that in LTBI and OTB group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The sensitivity and specificity were 82.00% and 91.67% respectively when the TBAG/PHA ratio was 0.2798 as the critical value to distinguish ATB from LTBI. **Conclusion** The ratio of TBAG/PHA can be used to diagnose ATB, and has good clinical value in identifying ATB and LTBI.

**Key words:** mycobacterium tuberculosis; antigens; plant lectins; tuberculosis; T cell spot test

目前,结核病是在世界范围内感染性疾病中病死率最高的疾病之一,严重威胁人类生存健康。据统计,全球约1/3人口感染过结核分枝杆菌(MTB),每年新发感染人数约800万,每年因结核病死亡人数更是高达200万<sup>[1-2]</sup>。目前,诊断结核病的主要方法为在患者分泌物、血液、体液及活组织中检出MTB,包括涂片法和分离培养法。涂片法灵敏度较低,阳性率

仅为30%~50%;分离培养法灵敏度较高,但耗时较长,需6~8周<sup>[3]</sup>,所以,这2种方法均不能满足临床诊断的需要。近年来,应用T细胞斑点试验(T-SPOT)检测外周血MTB感染,具有快速、准确等优点,但其无法区分活动性结核病(ATB)、潜伏性结核病(LTBI)和陈旧性结核病(OTB),因此,WHO并不推荐中、低收入国家使用T-SPOT诊断ATB<sup>[4]</sup>。因

作者简介:杨扬,女,初级技师,主要从事PCR方面的研究。△ 通信作者,E-mail:8051226@163.com。

本文引用格式:杨扬,向瑜. T-SPOT中TBAG/PHA比值在结核病诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(23):2926-2929.

此,亟需寻求一种新的方法鉴别诊断 ATB、LTBI 和 OTB。本研究探讨了 MTB 特异性抗原(TBAg)斑点数(sfc)与植物凝集素(PHA) sfc 的比值在鉴别诊断 ATB、LTBI 和 OTB 的应用价值,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2016 年 10 月至 2017 年 6 月本院收治的住院结核病患者 191 例,均进行了 T-SPOT. TB 检测且结果均呈阳性。通过查阅病历资料,191 例结核病患者中确诊为 ATB 患者 101 例,LTBI 患者 84 例,OTB 患者 6 例。ATB 诊断标准:(1)痰或干酪坏死的肉芽肿性活检标本中 MTB 培养阳性;(2)临床诊断结核病但缺乏病原学依据,经诊断性抗结核治疗有效;(3)不符合上述 2 条标准,未经相关抗结核治疗,临床症状自然消失则排除结核病的诊断。LTBI 诊断标准:T-SPOT 阳性且无结核临床症状或胸片检查正常。OTB 诊断标准:有长期结核病史且未恢复健康。排除标准:(1)年龄大于 70 岁或小于 18 岁;(2)存在急性病毒性感染;(3)孕妇;(4)合并矽肺、糖尿病和肿瘤等;(5)人免疫缺陷病毒抗体检测阴性;(6)正在接受免疫抑制治疗。

**1.2 试剂与仪器** T-SPOT. TB 试剂盒(英国 Oxford Immunotec 公司)、人淋巴细胞分离液及 MD-AIM-V 细胞培养液(天津美德太平洋生物公司)、RP-MI-1640 细胞培养液(天津灏洋华科生物公司)、Thermo Legend Mach 1. 6R 离心机、Thermo Forma Series II 培养箱、OLYMPUS CX21 生物显微镜等。

## 1.3 方法

**1.3.1 T-SPOT** 采集患者 5~8 mL 新鲜肝素抗凝全血,2 h 内送检。采用密度梯度离心法分离外周血单个核细胞。将 RPMI 1640 培养液与全血标本等体积混匀。按 2:1~3:1 体积比缓慢加到 Ficoll 淋巴细胞分离液表层,室温(18~25 °C)、1 000×g 离心 22 min。分离外周血单个核细胞,再加入 RPMI 1640 细胞培养液 10 mL,继续 600×g 离心 7 min。离心结束后弃上清液用 1 mL 培养液重悬,再加培养液 10 mL,继续 350×g 离心 7 min,然后弃上清液,加入 AIM-V 培养液,配置每毫升 250 万个细胞的细胞悬液(注意:在整个分离过程中温度需控制于 18~25 °C,且必须在无菌环境下进行,防止发生微生物污染)。取出包被了抗  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )抗体的微量板,在 4 个孔中各加入 50  $\mu$ L 细胞培养液(空白对照)、50  $\mu$ L 抗原 A 溶液——早期分泌靶抗原-6(ESAT-6)、50  $\mu$ L 抗原 B 溶液——培养滤液蛋白-10(CFP-10)和 50  $\mu$ L 阳性质控溶液(PHA),然后在每孔中加入 50  $\mu$ L 细胞重悬液。将微孔板置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 16~20 h。培养结束后在每个反应孔中加入磷酸盐缓冲液洗涤,至少 3 遍。拍干微孔板,加入用磷酸盐缓冲液 200 倍稀释的浓缩标记抗体工作液 50  $\mu$ L,2~8 °C

孵育 1 h,然后用磷酸盐缓冲液洗涤不能少于 3 次。最后在每个反应孔中加入 50  $\mu$ L 底物显色溶液,在室温条件下避光孵育 7 min 后彻底洗涤培养板从而终止反应,计数各个孔内深蓝色清晰的 sfc。

**1.3.2 结果判定** 依据抗原 ESAT-6 孔或抗原 CFP-10 孔的 sfc 判定结果:当空白对照孔 sfc<6 个时若抗原 ESAT-6 孔或抗原 CFP-10 孔 sfc-空白对照孔 sfc $\geq$ 6 则检测结果判定为阳性;当空白对照孔 sfc 为 6~10 个时若抗原 ESAT-6 孔或抗原 CFP-10 孔 sfc-空白对照孔 sfc $\geq$ 2 倍空白对照孔 sfc 则检测结果判定为阳性;若标本不符合上述标准,PHA 对照孔正常时检测结果判定为阴性。检测结果阳性表明该样本中存在针对 MTB 特异抗原的效应 T 细胞,反之不存在。分别对空白对照孔、抗原 ESAT-6 孔、抗原 CFP-10 孔和 PHA 对照孔进行读数,计数每个孔 sfc。计算得到 ESAT-6/PHA 比值和 CFP-10/PHA 比值,将 2 个比值中较大的数值定义为 TBAg/PHA 比值。

**1.4 统计学处理** 应用 GraphPad Prism 5.01 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验;计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验;采用受试者工作曲线(ROC)分析 TBAg/PHA 比值区分 ATB、LTBI 和 OTB 的最佳临界值,以 95%可信区间(95%CI),记录曲线下面积(AUC)、灵敏度(sensitivity)和特异性(specificity)的综合最高值。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 组患者一般资料比较** 191 例患者中 ATB 患者 101 例(52.9%),其中男 73 例(72.3%),女 28 例(27.7%);平均年龄(47.5 $\pm$ 11.7)岁。LTBI 患者 84 例(44.0%),其中男 48 例(57.1%),女 36 例(42.9%);平均年龄(43.3 $\pm$ 13.5)岁。OTB 患者 6 例(3.1%),其中男 5 例(83.3%),女 1 例(16.7%);平均年龄(44.3 $\pm$ 12.7)岁。3 组患者性别、年龄比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 1。

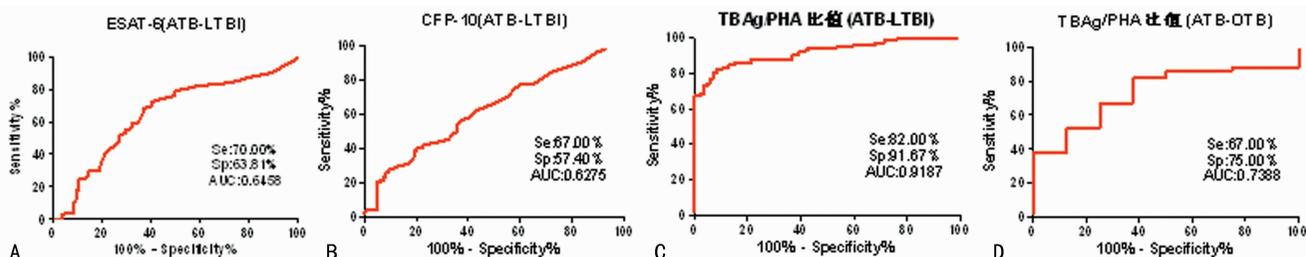
表 1 3 组患者一般资料比较

组别	<i>n</i>	性别( <i>n</i> )		年龄( $\bar{x}\pm s$ ,岁)
		男	女	
ATB 组	101	73	28	47.5 $\pm$ 11.7
LTBI 组	84	48	36	43.3 $\pm$ 13.5
OTB 组	6	5	1	44.3 $\pm$ 12.7

**2.2 3 组患者外周血 T-SPOT 检测结果比较** ATB 组患者 ESAT-6 sfc 和 CFP-10 sfc 与 LTBI 组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),与 OTB 组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。ATB 组患者 PHA sfc 显著低于 LTBI 组和 OTB 组,TBAg/PHA 比值显著高于 LTBI 组和 OTB 组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 3 组患者外周血 T-SPOT 检测结果比较

指标	活动性结核 (ATB) (n=101)	潜伏性结核 (LTBI) (n=84)	陈旧性结核 (OTB) (n=6)	P 值 (ATB,LTBI)	P 值 (ATB,OTB)
ESAT-6 sfc	29.98±24.94	23.11±28.18	32.75±25.45	0.000 7	0.760 2
CFP-10 sfc	37.04±39.93	22.98±28.25	35.25±26.04	0.002 9	0.569 2
PHA sfc	115.77±90.76	300.53±125.12	312.25±135.42	<0.000 1	0.000 1
TBAg/PHA 比值	0.750 6±0.474 5	0.130 9±0.103 4	0.376 2±0.243 5	<0.000 1	0.028 7



注:A为ESAT-6进行ROC分析确定ATB和LTBI阈值;B为CFP-10进行ROC分析确定ATB和LTBI阈值;C为TBAg/PHA比值进行ROC分析确定ATB和LTBI阈值;D为TBAg/PHA比值进行ROC分析确定ATB和OTB阈值

图 1 ROC 分析

**2.3 ROC 分析** ESAT-6 sfc 鉴别 ATB 和 LTBI 时 AUC 为 0.645 8(95%CI:0.564 1~0.727 4), 阈值取 17, 灵敏度为 70.00%, 特异性为 63.81%。见图 1A。CFP-10 sfc 鉴别 ATB 和 LTBI 时 AUC 为 0.627 5 (95%CI:0.547 2~0.707 8), 阈值取 16, 灵敏度为 67.00%, 特异性为 57.40%。见图 1B。TBAg/PHA 比值鉴别 ATB 和 LTBI 时 AUC 为 0.918 7(95%CI:0.879 4~0.957 9), 阈值取 0.279 8, 灵敏度为 82.00%, 特异性为 91.67%。见图 1C; TBAg/PHA 比值鉴别 ATB 和 OTB 时 AUC 为 0.738 8(95%CI:0.593 5~0.874 0), 阈值取 0.452 2, 灵敏度为 67.00%, 特异性为 75.00%。见图 1D。

**3 讨 论**

结核病是由 MTB 引起的一种慢性传染病, 可侵犯全身各个系统, 临床表现复杂多变, 尤其是肺外结核常因病情隐匿或表现不典型, 极易误诊、漏诊。目前, 诊断结核病的常用方法有涂片法、培养法和免疫学方法等, 均存在灵敏度低或特异性差、耗时长等缺点, 给临床诊断带来极大困扰。机体感染 MTB 后存在针对 MTB 特异性抗原的 T 淋巴细胞, 当机体再次受到结核特异性抗原刺激时 T 淋巴细胞转换为效应 T 淋巴细胞, 释放 IFN-γ。基于此原理发展起来的 T-SPOT 是目前检测结核病的优选方法, 已普遍用于临床检测<sup>[5]</sup>。

沈彦恒等<sup>[6]</sup>研究表明, T-SPOT 检测 MTB 感染灵敏度为 96.21%, 其诊断结果不会因卡介苗的接种而受到影响且与绝大多数非 MTB 无交叉反应, 提示其对结核病具有较好的诊断价值。另有研究表明, T-SPOT 诊断结核感染的特异性高于结核菌素皮试试验, 但其无法区分 ATB、LTBI 及 OTB<sup>[7]</sup>。在过去的

10 年中, T-SPOT 在儿童<sup>[8]</sup>和人类免疫缺陷病毒感染患者的结核诊断<sup>[9]</sup>、抗 TNF 治疗前的结核风险评估<sup>[10]</sup>, 以及肺外结核诊断中<sup>[11]</sup>均发挥了重要作用。尽管 T-SPOT 在多种特殊的结核诊断中均起到了不可或缺的作用, 但其最大局限性就是无法区分 ATB、LTBI 和 OTB。本研究采用新的 T-SPOT 结果计算方法辅助鉴别诊断 ATB、LTBI 和 OTB。

本研究结果显示, ATB 组患者 ESAT-6 sfc 和 CFP-10 sfc 与 OTB 组比较, 差异均无统计学意义 (P>0.05), 与其他研究不一致<sup>[12]</sup>, 分析其原因可能为 OTB 患者数较少 (6 例)。ATB 组患者 ESAT-6 sfc 和 CFP-10 sfc 与 LTBI 组比较, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。ESAT-6 sfc 和 CFP-10 sfc 鉴别 ATB 和 LTBI 的灵敏度分别为 70.00% 和 67.00%, 特异性分别为 63.81% 和 57.40%, 灵敏度和特异度均较低。同时, ESAT-6 和 CFP-10 的干扰素应答受个体免疫影响, 因此, ESAT-6 sfc 和 CFP-10 sfc 并不能用于鉴别结核病是 ATB、LTBI 或 OTB<sup>[13-14]</sup>。另外, 本研究结果显示, ATB 组患者 PHA sfc 显著低于 LTBI 及 OTB 组, 表明 ATB 与 LTBI 及 OTB 患者 PHA 干扰素应答显著不同。早有文献报道, 抑制促炎性细胞因子的产生, 调节性 T 细胞的增加及一氧化氮的持续产生可能会抑制 T 细胞的功能, 导致 ATB 患者免疫力受损, ATB 患者 PHA 干扰素应答减弱<sup>[15-16]</sup>。表明 T-SPOT 试验中 PHA 干扰素应答十分重要, 需对其进行评估和利用。因此, 本研究采用 TBAg/PHA 比值代替 ESAT-6 sfc 或 CFP-10 sfc, 以消除个体免疫差异所带来的影响, TBAg/PHA 比值较直接采用 ESAT-6 sfc 或 CFP-10 sfc 更具有说服力。本研究结果显示, ATB、LTBI 及 OTB 患者

TBAg/PHA 比值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。通过 ROC 分析, 以 TBAg/PHA 比值区分 ATB 和 OTB 效果不佳, 灵敏度和特异性均较低, 分别为 67.00% 和 75.00%。由于 OTB 组病例数过少 (6 例), TBAg/PHA 比值在区分 ATB 和 OTB 方面的价值应加大样本量进一步确认。本研究结果显示, 以 TBAg/PHA 比值为 0.279 8 作为区分 ATB 和 LTBI 的阈值, 灵敏度和特异性可分别达 82.00% 和 91.67%, 提示 TBAg/PHA 比值具有区分 ATB 和 LTBI 的辅助诊断价值。

TBAg/PHA 比值诊断结核病的优势在于: (1) TBAg/PHA 比值在鉴别 ATB、LTBI 和 OTB 方面差异显著, 该方法的诊断价值值得关注; (2) 该方法基于 T-SPOT 检测进行独立诊断, 并不需要与其他方法结合, 也不需额外的仪器、设备; (3) 该方法有助于消除在 T-SPOT 检测中个体免疫差异所造成的影响。然而, 本研究虽得出 TBAg/PHA 比值可用于辅助诊断 ATB 和 LTBI 的结论, 但尚存在以下几方面局限性: (1) 患者年龄分布为 18~70 岁, 在儿童和老年人中 TBAg/PHA 比值的作用并不清楚; (2) 本研究剔除了接受过免疫抑制治疗者, 因免疫抑制会影响 T-SPOT 结果; (3) 由于本研究旨在论证 TBAg/PHA 比值在 T-SPOT 阳性患者中诊断结核的作用, 故未纳入 T-SPOT 结果阴性的 MTB 感染者。

#### 4 结 论

T-SPOT 检测中的 TBAg/PHA 比值相较 ES-AT-6 sfc 或 CFP-10 sfc 更具有优势, 能消除个体免疫差异的影响, 在鉴别 ATB 和 LTBI 中具有应用价值。但鉴于本研究为有局限性的单中心研究且样本量较小, 特别是 OTB 样本量过小, 因此, 将该方法用于 ATB、LTBI 及 OTB 的区分方面仍需进行进一步的研究验证。

#### 参考文献

[1] WHO. Global Tuberculosis Control report 2006 [R]. World Health Organization, 2006.

[2] YEW WW, LEUNG CC. Update in tuberculosis 2007 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(5): 479-485.

[3] DIEL R, LODDENKEMPER R, NIENHAUS A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis [J]. Chest, 2010, 137(4): 952-968.

[4] PINTO LM, GRENIER J, SCHUMACHER SG, et al. Immunodiagnosis of tuberculosis: state of the art [J]. Med Princ Pract, 2012, 21(1): 4-13.

[5] LALVANI A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle And old enemy [J]. Chest, 2007, 131(6): 1898-1906.

[6] 沈彦恒, 桂徐蔚, 沈芸, 等. T 细胞斑点检测在鉴别结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌感染中的价值 [J]. 中国医刊, 2016, 51(4): 78-81.

[7] 黄汉鹏. 比较结核感染 T 细胞斑点试验、结核菌素试验以及血清结核抗体检测对诊断肺结核的价值 [J]. 中外医疗, 2016, 35(35): 41-42.

[8] 钟华清, 徐梦华, 卢丽娟, 等. 干扰素- $\gamma$  释放试验在儿童结核感染中的应用价值 [J]. 检验医学, 2016, 31(3): 176-179.

[9] 童学成, 陈国春, 濮翔科, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验对艾滋病合并肺结核的临床诊断价值 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(14): 3632-3634.

[10] Campainha S, Gomes T, Carvalho A, et al. Negative predictive value of TST and IGRA in anti-TNF treated patients [J]. Eur Respir J, 2012, 40(3): 790-791.

[11] 霍霏霏, 张丽帆, 刘晓清. 评价  $\gamma$  干扰素释放分析 T-SPOT. TB 在肺外结核病诊断中的敏感性 [J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(4): 449-452.

[12] 向瑜, 杨捷, 张莉萍. T 细胞斑点试验反应强度在诊断活动性结核病中的价值 [J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(12): 1456-1459.

[13] AMANATIDOU V, SYRIDOU G, MAVRIKOU M, et al. Latent tuberculosis infection in children: diagnostic approaches [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(7): 1285-1294.

[14] JANSSENS JP, ROUX-LOMBARD P, PERNEGER T, et al. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis [J]. Eur Respir J, 2007, 30(4): 722-728.

[15] CHEN X, ZHOU B, LI M, et al. CD4 (+) CD25 (+) FoxP3 (+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease [J]. Clin Immunol, 2007, 123(1): 50-59.

[16] METCALFE JZ, CATTAMANCI A, VITTINGHOFF E, et al. Evaluation of quantitative IFN-gamma response for risk stratification of active tuberculosis suspects [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(1): 87-93.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-08-21)