

· 论 著 ·

CD161 流式细胞术对活动性肺结核诊断效能的评价*

张雅曦, 张明霞, 杨倩婷, 孟 娟, 余志勇, 陈 骑[△]

深圳市第三人民医院肝病研究所, 广东深圳 518112

摘 要: **目的** 探讨以淋巴细胞表面分子 CD161 为标识的流式细胞术对活动性肺结核的诊断价值。**方法** 回顾性研究 2020 年 4—12 月在该院住院的活动性肺结核患者 268 例, 其中痰涂片结果为阳性的患者 170 例作为涂阳组, 3 次或以上痰涂片结果未见结核分枝杆菌(TB)的患者 98 例为涂阴组。另选取该院的体检健康者 138 例为对照组。采用流式细胞术检测各组淋巴细胞、单核细胞和 CD161 阳性淋巴细胞比例。基于流式细胞术建立深度学习网络模型对活动性肺结核进行诊断, 并与 GeneXpert、TB-DNA、酶联免疫斑点(Elispot)试验的诊断效能进行比较。**结果** 各组淋巴细胞、单核细胞和 CD161 阳性淋巴细胞比例及 OR 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); GeneXpert、TB-DNA、痰培养、Elispot 在涂阳患者中的检出率分别为 87.65%、81.18%、60.00%、85.29%, 深度学习网络模型在涂阳结核、涂阴结核患者中的检出率分别为 77.05%、71.42%; 深度学习网络模型鉴别涂阳组和对照组的受试者工作特征曲线下面积(AUC)为 0.87(95%CI 0.84~0.91), 准确率为 0.82, 灵敏度为 0.77, 特异度为 0.84, 鉴别涂阴组和对照组的 AUC 为 0.79(95%CI 0.73~0.85), 准确率为 0.71, 灵敏度为 0.71, 特异度为 0.84。**结论** 以 CD161 为标识的流式细胞术结合深度学习网络模型可为辅助诊断活动性肺结核提供新的方向, 特别是在涂阴活动性肺结核的诊断中, 并对指导临床抗结核治疗用药及预测活动性肺结核复发有参考价值。

关键词: 活动性肺结核; 流式细胞术; CD161; 深度学习网络模型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.12.003

中图法分类号: R446.19

文章编号: 1673-4130(2023)12-1421-04

文献标志码: A

Evaluation of the diagnostic efficacy of CD161 flow cytometry in active pulmonary tuberculosis*

ZHANG Yaxi, ZHANG Mingxia, YANG Qianting, MENG Juan, YU Zhiyong, CHEN Qi[△]

Institute of Hepatology, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518112, China

Abstract: **Objective** To explore the diagnostic value of flow cytometry with lymphocyte surface molecule CD161 in active pulmonary tuberculosis. **Methods** A retrospective study was conducted on totally 268 patients with active pulmonary tuberculosis who were hospitalized in this hospital from April to December 2020. Among them, 170 patients with positive sputum smear results were selected as the smear positive group, and 98 patients with no Mycobacterium tuberculosis (TB) in sputum smear results for three or more times were selected as the smear negative group. Another 138 healthy people were selected as the control group. Flow cytometry was used to detect the proportion of lymphocytes, monocytes and CD161 positive lymphocytes in each group. A deep learning network model based on flow cytometry was established to diagnose active pulmonary tuberculosis, and its diagnostic efficiency was compared with GeneXpert, TB-DNA and enzyme-linked immunospot (Elispot) test. **Results** There were significant differences in the percentages of lymphocytes, monocytes and CD161 positive lymphocytes and OR among the groups ($P < 0.05$). The detection rates of GeneXpert, TB-DNA, sputum culture and Elispot test in smear positive patients were 87.65%, 81.18%, 60.00% and 85.29%, respectively. The detection rates of the deep learning network model in smear positive tuberculosis and smear negative tuberculosis patients were 77.05% and 71.42%, respectively. The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) of the deep learning network model for identifying subjects in the smear positive group and the control group was 0.87 (95%CI 0.84—0.91), the accuracy was 0.82, the sensitivity was 0.77, and the specificity was 0.84. The AUC of the deep learning network model for identifying subjects in the smear negative group and the control group was 0.79 (95%CI 0.73—0.85), the accuracy was 0.71, the sensitivity was 0.71, and the specificity was 0.84. **Conclusion** CD161 based flow cytometry combined with

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82172286); 深圳市科技计划基础研究面上项目(JCYJ20210324131603008, CJGJZD20220517141404010)。

作者简介: 张雅曦, 女, 研究实习生, 主要从事结核病基础免疫技术研发及应用相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: chenqi0539@163.com。

deep learning network model can provide a new direction for auxiliary diagnosis of active pulmonary tuberculosis, especially in the diagnosis of smear-negative active pulmonary tuberculosis, and has reference value for guiding clinical anti-tuberculosis treatment and predicting active pulmonary tuberculosis recurrence.

Key words: active pulmonary tuberculosis; flow cytometry; CD161; deep learning network model

结核病是危害全球公众健康的一种常见的慢性传染性疾病,感染途径主要是通过呼吸道感染兼性胞内致病结核分枝杆菌(TB)^[1]。早期诊断和及时治疗活动性肺结核,可阻止结核病患者在社区内的进一步传播。然而,通过病原学诊断疑似结核病患者可能需要很长时间,花费较高,导致临床诊断滞后和治疗延误^[2]。有研究表明,全球每年近 1 040 万例新发结核病病例和 180 万例死亡病例^[3],因此,改进和加快诊断评估手段仍然是结核病患者临床诊断和公共卫生重点。

本课题组在前期工作中,利用流式细胞术对不同类型的细胞表面分子和临床标本进行分析,发现活动性肺结核患者 CD161 水平明显低于健康者和潜伏感染者,并且流式细胞术能简单区分活动性肺结核患者和健康者^[4-5]。在此基础上,为更有效区分不同类型的结核病患者,利用目前流行的深度学习网络建立分类模型,探索 CD161 在活动性肺结核中的辅助诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2020 年 4—12 月在本院住院的 268 例确诊为活动性肺结核患者的临床资料,其中痰涂片结果为阳性(涂阳)的患者 170 例为涂阳组,3 次或以上痰涂片结果未见 TB(涂阴)的患者 98 例为涂阴组,并对其中初治结核患者(47 例)和耐多药结核患者(37 例)进行跟踪随访。另选取本院的体检健康者 138 例为对照组。结核病患者诊断根据相关标准执行^[6],涂阳患者:痰涂片为阳性,诊断类型为继发性;涂阴患者:细菌学阴性,初治无合并其他传染病、自身免疫性疾病;结核治愈患者:正规抗结核治疗时间 6 个月以上,病原学检测阴性,多次影像学胸部 CT 检查无明显变化,停止抗结核治疗达到非活动性肺结核或陈旧肺结核标准。体检健康者:均经胸部 X 线或 CT 检查,排除肺部结核及肺外部位结核,既往无结核史,无结核接触史,未服用过抗结核药物。

1.2 仪器与试剂 全自动荧光定量 PCR 仪(型号:ABI-7500)购自美国赛沛公司,酶联免疫斑点(Elispot)试验读板仪购自美国 CTL 公司,细胞流式仪 Canto II 购自美国 BD 公司。TB-DNA 核酸检测试剂盒(批号:20200801)购自达安基因股份有限公司, GeneXpert 检测试剂盒(批号:1000166969)购自深圳市同春和生物科技有限公司, γ 干扰素释放试验(IGRAs)试剂盒(批号:20200600905)购自北京同生时代生物科技有限公司,流式 CD161 试剂盒(批号:20200501)购自深圳市联合医学科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采用肝素锂抗凝管采集受试者新

鲜外周血 8 mL 用于 Elispot 试验,采用乙二胺四乙酸二钾抗凝管采集受试者新鲜外周血 2 mL 用于流式 CD161 检测,结核病患者留取有效晨痰 3~4 份标本用于细菌学检测。

1.3.2 流式细胞术 流式结果用软件 FlowJo 进行分析,分别圈出单核细胞(CD45⁺ CD64⁺)、淋巴细胞(CD45⁺ CD64⁻)、CD161⁺ 细胞(CD45⁺ CD64⁻ CD161⁺),最后得出单核细胞比例(M%)、淋巴细胞比例(L%)和 CD161 阳性淋巴细胞比例(CD161⁺%)。

1.3.3 深度学习网络模型的构建及运算 根据深度学习网络模型的训练机制,将数据集按照 4 : 1 的比例随机划分为训练集和测试集,以拟合出网络模型对该数据的最佳性能。深度学习网络模型的构建采用用 TensorFlow 的 Keras 数据库,建立 4 层序贯式神经网络。输入层为 3 个维度,即 M%、L% 和 CD161⁺%;隐藏层包括 3 层全连接层,激活函数均为修正线性单元(ReLU),其中第 2 层为随机失活 dropout 层^[5];最后 1 层为输出层,激活函数为 sigmoid,优化器为 Adam,输出类别为 TB。模型默认以 0.45 为判断值,即每个标本预测概率值(OR) $\geq$ 0.45 为结核病患者,否则为健康者。模型性能评判指标包括受试者工作特征(ROC)曲线、灵敏度、特异度、准确率等。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 ROC 曲线分析诊断效能。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同检测方法在活动性肺结核中的诊断效能 结果显示, GeneXpert 在涂阳组和涂阴组中的检出率分别为 87.65%、28.57%, TB-DNA 的检出率分别为 81.18%、20.41%, 痰培养的检出率分别为 60.00%、24.48%, Elispot 试验的检出率分别为 85.29%、64.28%。见表 1。

表 1 不同检测方法在活动性肺结核中的诊断效能[n(%)]

组别	<i>n</i>	痰培养	GeneXpert	TB-DNA	Elispot 试验
对照组	138	—	—	—	23(16.67)
涂阳组	170	102(60.00)	149(87.65)	138(81.18)	145(85.29) ^a
涂阴组	98	24(24.49) ^b	28(28.57) ^b	20(20.41) ^b	63(64.29) ^{ab}

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05;与涂阳组比较,^b*P* < 0.05;—为此项无数据。

2.2 基于流式细胞术的深度学习网络模型的构建与

运算 结果显示, 各组 L%、CD161⁺%、M%、OR 比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2。通过大量数据在训练集上构建深度学习网络模型, 发现模型能很好鉴别涂阳组和对照组, 测试集的 ROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.87 (95%CI 0.84~0.91), 准确率为 0.82, 灵敏度为 0.77, 特异度为 0.84; 鉴别涂阴组和对照组的 AUC 为 0.79 (95%CI 0.73~0.85), 准确率为 0.71, 灵敏度为 0.71, 特异度为 0.84。见表 3、图 1。

表 3 深度学习网络模型对各组的诊断效能

项目	AUC(95%CI)	P	准确率	灵敏度(95%CI)	特异度(95%CI)
对照组 vs. 涂阳组	0.87(0.84~0.91)	<0.001	0.82	0.77(0.70~0.83)	0.84(0.79~0.91)
对照组 vs. 涂阴组	0.79(0.73~0.85)	<0.001	0.71	0.71(0.69~0.84)	0.84(0.77~0.90)

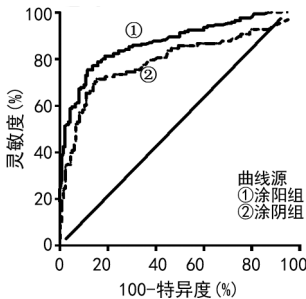


图 1 深度学习网络模型对各组的诊断效能

2.3 深度学习网络模型在抗结核治疗指标的评估 Elispot 试验在涂阳结核、涂阴结核和结核治愈患者中的检出率分别为 85.29%、64.28%、61.50%, 而深度学习网络模型的检出率分别为 77.05%、71.42%、16.84%。

为了验证深度学习网络模型在抗结核治疗中的动态表现, 随访了 84 例活动性肺结核患者, 其中初治结核 47 例, 耐药结核 37 例。在治疗 0、3、6 个月时检测 L%、M% 和 CD161⁺%, 并在测试集上验证, 阈值 ≥ 0.45 为阳性。结果显示, 初治结核患者 0、3、6 个月时 OR 均值分别为 0.741、0.433、0.304, 检出率分别为 82.97%、46.80%、19.10%; 耐药结核患者 OR 均值分别为 0.683、0.520、0.525, 检出率分别为 72.90%、48.64%、51.35%。见表 4。

表 4 深度学习网络模型在抗结核治疗指标的评估

项目	n	治疗 0 个月 OR 均值/检出率	治疗 3 个月 OR 均值/检出率	治疗 6 个月 OR 均值/检出率
初治结核	47	0.741(82.97%)	0.433(46.80%)	0.304(19.10%)
耐药结核	37	0.683(72.90%)	0.520(48.64%)	0.525(51.35%)

3 讨论

早发现、早治疗是所有传染性疾病的防控策略, 是消除疾病和降低疾病病死率的重要手段。然而目前的医学研究水平对于结核病的早期快速诊断和短程高效治疗略有延迟或不足, 流行病学调查结果显示, 新增感染、耐多药结核例数及结核病病死率逐年

表 2 各组 L%、M%、CD161 ⁺ %、OR 比较					
组别	n	L%	M%	CD161 ⁺ %	OR
涂阳组	170	72.36±13.07	25.35±12.32	30.94±9.77	0.74±0.30
涂阴组	98	71.47±14.11	25.72±12.65	31.29±8.34	0.65±0.27
对照组	138	77.57±6.09	20.62±7.01	34.97±0.25	0.25±0.15
P		<0.001	<0.001	0.003	<0.001

增长有诸多因素, 但缺乏快速、早期诊断结核病感染的方法是关键的原因之一^[6]。无法早期有效治疗和有效控制传染源, 可导致结核病快速间接或直接传播扩散。

研究结核病早期、快速、特异、灵敏且低费用的检测方法和手段是实验室的终极目标。目前临床为准确诊断结核病, 联合多指标、多手段来解决诊治难的问题。其中分子生物学 GeneXpert 检测技术具有较高的特异度和灵敏度, TB-DNA 等方法可极大提高有痰液结核病患者的确诊率^[7-8]。在检出涂阳患者的各种方法学中, GeneXpert 特异度较高, 但缺点是临床有部分无痰液患者无法检测^[9]; IGRAs 法检测标本易得, 可以区分健康者和潜伏感染者, 但无法鉴别活动性肺结核和潜伏感染者^[10-11]; 微创支气管纤维镜能使临床医生更直观了解 TB 引起的肺部病灶, 其中肺泡灌洗液的 TB 培养可提高无痰患者、涂阴患者的检出率^[12-13]。因此, 联合诊断可提高检出率, 减少漏检, 但高昂费用和检测平台的建立并无普及优势。

CD161 被认为是 Th17 细胞的标志物^[14-15], Th17 细胞分泌的白细胞介素-17A 和白细胞介素-17F 两种前炎症因子在 TB 清除中起到重要作用^[16-17]。CD161 表达细胞另一个重要的基团是黏膜相关恒定的 T 淋巴细胞(MAIT)^[17-19], 在宿主病原体防御中发挥重要作用, 尤其是与重症患者细菌感染炎症密切相关^[20]。本研究基于 CD161 流式细胞术结果, 通过人工智能算法建立判断方法, 其检测结果更为客观。目前的研究认为单指标的诊断有较大的局限性, 其灵敏度和特异度还有待提高。因此, 研究人员尝试通过组合不同的标志物建立人工智能分类模型提高检出率。而作为机器学习的分支, 深度学习网络模型在复杂问题上更具优势, 且不需要太关注特征工程相关工作^[21]。研发高效、人工智能化、快速、灵敏、特异、准确、经济实用的检测方法可为结核病的防控提供有力的支持。

利用流式细胞术检测 CD161、淋巴和单核细胞的比例, 结合深度学习网络模型, 能有效分辨出健康者及结核病患者, 其鉴别健康者和涂阳患者的灵敏度、

特异度分别为 0.77、0.84, 鉴别健康者和涂阴患者的灵敏度、特异度分别为 0.71、0.84, 在涂阴患者中的准确率(即检出率)为 0.71。而痰培养、GeneXpert、TB-DNA、Elisopt 在涂阴患者中的检出率分别为 24.49%、28.57%、20.41%、64.29%, 提示该技术在涂阴结核中的检出率明显高于其他检测方法的检出率。这些结果提示, 该检测方法对于涂阴结核患者的诊断有辅助效能。

目前关于结核病治疗效果的判断, 临床上主要依靠临床症状的改变及影像学的变化判断, 因此非常依赖临床医生的经验。本研究发现 CD161 流式细胞术对于结核病治疗疗效有一定的指导意义, 其 CD161 评分(OR 均值)在结核治愈患者(治疗 6 个月)较结核病患者(治疗 0 个月)降低, 提示结核治愈患者中 CD161 可随体内 TB 的清除, 而降至正常水平。其中初治患者在抗结核治疗 3 个月 OR 均值开始明显下降, 6 个月降至正常范围。然而, 耐药结核患者 OR 均值维持在较高水平, 与患者病情保持一致。因此, 通过监测 CD161 的变化可以提示在结核病治疗中的不同人群是否已达到治愈或非活动性肺结核标准, 减少抗结核药物对各组织器官带来的损伤。

综上所述, 本研究结果表明以 CD161 为标识的流式细胞术结合深度学习网络智能模型可作为辅助诊断技术, 在指导临床抗结核治疗用药时间及非活动性肺结核复发预测中具有参考价值。当然本研究只是小样本的检测结果, 下一步需要扩大样本进行多中心的检测证实研究的可行性。

参考文献

- [1] RANGAKA M X, CAVALCANTE S C, MARAIS B J, et al. Controlling the seedbeds of tuberculosis: diagnosis and treatment of tuberculosis infection[J]. *Lancet*, 2015, 386(10010): 2344-2353.
- [2] LIM W S. From latent to active TB: are IGRAs of any use[J]. *Thorax*, 2016, 71(7): 585-586.
- [3] CHAKAYA J, KHAN M, NTOUMI F, et al. Global tuberculosis report 2020-reflections on the global TB burden, treatment and prevention efforts[J]. *Int J Infect Dis*, 2021, 113(Suppl 1): S7-S12.
- [4] YANG Q T, XU Q, CHEN Q, et al. Discriminating active tuberculosis from Latent tuberculosis infection by flow cytometric measurement of CD161-expressing T cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 17918.
- [5] 张惠华, 陈骑, 杨倩婷, 等. 基于 CD161 的深度学习网络在活动性肺结核临床诊断中的应用[J]. *生物医学转化*, 2021, 2(2): 91-98.
- [6] 陈雪融, 陈效友. 经验医学向精准医学的转变:《肺结核诊断》(WS 288-2017)解读[J]. *华西医学*, 2018, 33(8): 950-952.
- [7] HO J, NGUYEN P T B, NGUYEN T A, et al. Reassessment of the positive predictive value and specificity of Xpert MTB/RIF: a diagnostic accuracy study in the con-

text of community-wide screening for tuberculosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(9): 1045-1051.

- [8] MIOTTO P, BIGONI S, MIGLIORI G B, et al. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert(R) MTB/RIF[J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(5): 1269-1271.
- [9] DIEHL R, NIENHAUS A, HILLEMANN D, et al. Cost-benefit analysis of Xpert MTB/RIF for tuberculosis suspects in German hospitals[J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(2): 575-578.
- [10] LU L L, SMITH M T, YU K K Q, et al. IFN- γ -independent immune markers of Mycobacterium tuberculosis exposure[J]. *Nat Med*, 2019, 25(6): 977-987.
- [11] ZELLWEGER J P, SOTGIU G, BLOCK M, et al. Risk assessment of tuberculosis in contacts by IFN- γ release assays. A tuberculosis network european trials group study[J]. *Am J Respir Care Med*, 2015, 191(10): 1176-1184.
- [12] XU P, TANG P, SONG H F, et al. The incremental value of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high-burden urban setting[J]. *J Infect*, 2019, 79(1): 24-29.
- [13] LIU X, HOU X F, GAO L, et al. Indicators for prediction of Mycobacterium tuberculosis positivity detected with bronchoalveolar lavage fluid[J]. *Infect Dis Poverty*, 2018, 7(1): 22.
- [14] KONDURI V, OYEWOLE-SAID D, VAZQUEZ-PJER-EZ J, et al. CD8⁺ CD161⁺ T-cells: cytotoxic memory cells with high therapeutic potential [J]. *Front Immunol*, 2021, 11: 613204.
- [15] ANNUNZIATO F, COSMI L, LIOTTA F, et al. Main features of human T helper 17 cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2013, 1284: 66-70.
- [16] LYADOVA I V, PANTELEEV A V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 854507.
- [17] GUEDAN S, CHEN X, MADAR A, et al. ICOS-based chimeric antigen receptors program bipolar TH17/TH1 cells[J]. *Blood*, 2014, 124(7): 1070-1080.
- [18] SULIMAN S, GELA A, MENDELSON S C, et al. Peripheral blood mucosal-associated invariant T cells in tuberculosis patients and healthy Mycobacterium tuberculosis-exposed controls[J]. *J Infect Dis*, 2020, 222(6): 995-1007.
- [19] ZHAO L L, NOCTURNE G, HASKETT S, et al. Clinical relevance of ROR γ positive and negative subsets of CD161⁺ CD4⁺ T cells in primary Sjögren's syndrome[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2017, 56(2): 303-312.
- [20] GRIMALDI D, BOURHIS L L, SAUNEUF B, et al. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections[J]. *Intensive Care Med*, 2014, 40(2): 192-201.
- [21] KULKSARNI S, JHA S. Artificial intelligence, radiology, and tuberculosis: a review[J]. *Acad Radiol*, 2020, 27(1): 71-75.