·论著·

三种检测技术对肺结核辅助诊断价值的研究

史祥　尹洪云　沙巍　肖和平

【摘要】 目的　评价痰液结核分枝杆菌采用实时荧光核酸恒温扩增检测技术(simultaneous amplification and testing, SAT)、外周血结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT. TB)及血清结核抗体(TB-Ab)检测等 3 种检测方法对肺结核的辅助诊断价值。**方法**　选取上海市肺科医院 2014 年 11 月至 2015 年 10 月期间临床确诊为肺结核的住院患者作为肺结核组，共 689 例。选取同时期上海市肺科医院住院的肺部非结核性疾病患者作为非肺结核组，共 291 例。收集研究对象临床资料及 T-SPOT. TB、SAT、血清 TB-Ab 检测结果，以肺结核临床诊断为金标准，计算 3 种方法单独及联合检测(3 种方法联合检测时任一种方法检测结果阳性则诊断为肺结核，联合检测结果均为阴性时判断为阴性)的诊断效能指标，并绘制受试者工作曲线(ROC 曲线)，评价其对肺结核的诊断价值。**结果**　T-SPOT. TB 检测敏感度为 90.67%(593/654)，特异度为 68.09%(192/282)。SAT 检测敏感度为 30.43%(133/437)，特异度为 100.00%(87/87)。TB-Ab 检测敏感度为 43.95%(298/678)，特异度为 78.82%(227/288)。3 种方法联合检测的敏感度为 93.14%(285/306)，特异度为 53.41%(47/88)；T-SPOT. TB 和 TB-Ab 联合检测的敏感度为 92.83%(440/474)，特异度为 52.11%(148/284)。绘制 3 种检测方法诊断肺结核的 ROC 曲线，T-SPOT. TB、SAT 检测对应的曲线下面积(AUC)分别为 0.798 和 0.652；T-SPOT. TB+SAT+TB-Ab、T-SPOT. TB+TB-Ab 联合检测对应的 AUC 值分别为 0.865 和 0.843。**结论**　T-SPOT. TB、SAT 及 TB-Ab 联合检测辅助诊断肺结核价值较高，T-SPOT. TB 和 TB-Ab 联合检测次之；单项检测中，SAT 检测特异度最高，T-SPOT. TB 诊断价值最大。

【关键词】 结核，肺；　诊断技术和方法；　评价研究；　数据说明，统计

Study on the value of three kinds of detection techniques for the diagnosis of pulmonary tuberculosis

SHI Xiang, YIN Hong-yun, SHA Wei, XIAO He-ping. Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University; Shanghai Key Laboratory for (Pulmonary) Tuberculosis; the Clinical Study Center of Tuberculosis, Shanghai 200433, China
Corresponding author: XIAO He-ping, Email: xiaoheping_sars@163.com

【Abstract】 Objective　To evaluate the diagnostic value of sputum simultaneous amplification and testing (SAT) for tuberculosis (TB), peripheral blood T-SPOT. TB and serum TB-Ab in patients with pulmonary tuberculosis. **Methods**　By reviewing the clinical data and tests results (T-SPOT. TB, SAT and serum TB-Ab) of 980 patients hospitalized in Shanghai Pulmonary Hospital (689 patients with pulmonary tuberculosis and 291 patients with non-tuberculosis lung diseases) from Nov 2014 to Oct 2015, the diagnostic sensitivity and specificity of the three methods were compared. Taking the clinical diagnosis of pulmonary tuberculosis as the gold standard, we calculated the diagnostic efficiency indexes of the three methods, while they were separately or jointly tested in these patients, and drew the receiver operating characteristic (ROC) curves to evaluate their diagnostic value for tuberculosis. As to joint testing, patients were diagnosed as pulmonary tuberculosis if one of the involved tests showed positive results, whereas patients were judged as non-pulmonary tuberculosis if all involved tests showed negative results. **Results**　The sensitivity of T-SPOT. TB was 90.67% (593/654), while the specificity was 68.09% (192/282). The sensitivity of SAT was 30.43% (133/437), while the specificity was 100.00% (87/87). The sensitivity of TB-Ab was 43.95% (298/678), while the specificity was 78.82% (227/288). The sensitivity of the co-detection of the three methods was 93.14% (285/306), while the specificity was 53.41% (47/88). The sensitivity of T-SPOT. TB combined with TB-Ab was 92.83% (440/474), while the specificity was 52.11% (148/284). After drawing the ROC curves to evaluate T-SPOT. TB and SAT detections' performances in diagnosing pulmonary tuberculosis, T-SPOT. TB and SAT-TB tests achieved the areas under the curve (AUC) of 0.798 and 0.652, respectively; and the AUC for T-SPOT. TB+SAT+TB-Ab and T-SPOT+TB-Ab were 0.865 and 0.843, respectively. **Conclusion**　The co-detection of the three methods, T-SPOT. TB, SAT and TB-Ab, was the most valuable method for the diagnosis

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2018.02.012

作者单位：200433 同济大学附属上海市肺科医院结核科 上海市结核(肺)重点实验室 上海市肺科医院结核病临床研究中心
通信作者：肖和平，Email：xiaoheping_sars@163.com

of pulmonary tuberculosis. Combining detection of T-SPOT. TB and TB-Ab could be the second choice. If we only tested one of the three, T-SPOT. TB was the highest valuable detection for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, and the highest specificity belonged to sputum SAT detection.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; Diagnostic techniques and procedures; Evaluation studies; Data interpretation, statistical

结核分枝杆菌培养阳性是诊断结核病的金标准，但罗氏培养法需 1～2 个月得出结果，快速培养法平均需要 18 d，因此，临床亟需能够尽快得出诊断结果的方法。笔者回顾分析 2014 年 11 月至 2015 年 10 月在上海市肺科医院住院的 980 例患者的临床资料，评价采用外周血结核感染 T 淋巴细胞斑点试验（T-SPOT. TB）、痰液结核分枝杆菌实时荧光核酸恒温扩增检测技术（simultaneous amplification and testing，SAT），以及血清结核抗体（TB-Ab）检测对结核病的临床诊断价值。

对象和方法

1. 对象：选取上海市肺科医院 2014 年 11 月至 2015 年 10 月期间确诊为肺结核的住院患者作为肺结核组，共 689 例，平均年龄（41.77±18.60）岁；其中，痰涂片结核分枝杆菌阳性者 179 例，阴性者 510 例；任何标本（痰液、胸腔积液、穿刺液、活检标本、气管镜冲洗液等）涂片和（或）培养结核分枝杆菌阳性者 310 例，阴性者 379 例；初治肺结核 596 例，并发肺外结核者 278 例。选取同时期上海市肺科医院住院的肺部非结核性疾病患者作为非肺结核组，共 291 例，平均年龄（53.69±16.91）岁，包括肺部恶性肿瘤 68 例，普通细菌性肺炎 135 例，支气管扩张伴感染 32 例，肺真菌病 11 例，其他呼吸系统疾病 45 例（包括间质性肺病、结节病等）。肿瘤患者均经病理学、细胞学证实，其他疾病根据患者临床症状体征、常规化验检查、影像学检查表现及临床治疗疗效等证实。两组均已剔除细菌学培养证实为非结核分枝杆菌感染的患者；所有患者均无人类免疫缺陷病毒（HIV）感染或免疫抑制剂药物治疗史，无妊娠期妇女。

2. 肺结核诊断标准：结核病的诊断参照文献[1]。胸部 CT 扫描显示的征象支持肺结核，痰涂片抗酸杆菌（acid-fast bacilli，AFB）阳性，抗结核药物治疗有效。胸部 CT 扫描显示的征象支持肺结核，痰涂片 AFB 阴性，但具备以下其一者：痰液以外任何标本涂片或培养 AFB 阳性、痰液培养 AFB 阳性、诊断性抗结核药物治疗 2 个月后行胸部 CT 扫描复查证实有效。

3. 全血 T-SPOT. TB 检测：采用上海复星长征科学有限公司生产的试剂盒。使用肝素锂抗凝真空采血管抽取患者静脉血 5 ml，18～25 ℃储存，4 h 内送检。外周血单个核细胞的计数采用显微镜下人工计数法。根据抗原 A（早期分泌靶抗原 6）和抗原 B（培养滤液蛋白 10）测试孔的反应判断结果：（1）阴性对照孔斑点数为 0～5 个，测试孔斑点数－阴性对照孔斑点数≥6，判断为阳性；（2）阴性对照孔斑点数≥6，抗原 A 或抗原 B 斑点数≥2 倍无反应性对照孔斑点数，判断为阳性。

4. SAT 检测：采用上海仁度生物科技有限公司生产的 SAT-TB 检测试剂盒，根据说明书进行操作。将预处理的标本按 1∶100 的比例用 TB 稀释液（采用焦碳酸二乙酯处理过的无菌水配制的 10 mmol/L 柠檬酸钠）进行稀释，放入超声波清洗器中进行超声处理 15 min，超声功率为 300 W。超声处理结束后，取出 2 μl 处理物加入 30 μl 扩增检测液（含 40 mmol/L 的 Tris-HCL 缓冲液，pH＝8.1）中，开启恒温荧光检测仪器（上海精宏实验设备有限公司），按仪器操作手册设定反应程序，荧光素通道设定为 6-羧基荧光素（FAM）42 ℃ 1 min，40 个循环；荧光信号收集每分钟进行 1 次，共检测 40 次。反应结束后置于恒温混匀仪（上海精宏实验设备有限公司）中 42 ℃保温 5 min，同时将 SAT 酶液（含 M-MLV 逆转录酶和 T7 RNA 转录酶各 2000 U）也预热到 42 ℃加入反应管，快速转至恒温荧光检测仪上进行检测。

5. TB-Ab 检测：采用上海奥普生物医药公司的结核分枝杆菌抗体胶体金法诊断试剂盒，应用斑点免疫金渗滤法。

6. 统计学分析：应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。以肺结核临床诊断为金标准，分别评价 T-SPOT. TB、SAT 及 TB-Ab 检测单独及联合检测对肺结核诊断效能。各项指标计算方法：敏感度＝真阳性例数/（真阳性例数＋假阴性例数）×100%；特异度＝真阴性例数/（真阴性例数＋假阳性例数）×100%；阳性预测值＝真阳性例数/（真阳性例数＋假阳性例数）×100%；阴性预测值＝真阴性例数/（真阴性例数＋假阴性例数）×100%。同时，绘制受试者工作特征（receiver operating

characteristic, ROC)曲线评价各方法单独及联合检测对肺结核诊断效能，计算曲线下面积(AUC)。

结　果

1. 痰液 SAT 检测结果：共有 524 例患者行痰液 SAT 检测，其中肺结核组 437 例，非肺结核组 87 例。以临床诊断为金标准，SAT 检测的敏感度为 30.43%(133/437)，特异度为 100.00%(87/87)，阳性预测值为 100.00%(133/133)，阴性预测值为 77.75%(304/391)。

2. 外周血 T-SPOT. TB 检测结果：共有 936 例患者行 T-SPOT. TB 检测，其中肺结核组 654 例，非肺结核组 282 例。以临床诊断为金标准，T-SPOT. TB 检测敏感度为 90.67%(593/654)，特异度为 68.09%(192/282)，阳性预测值为 86.82%(593/683)，阴性预测值为 75.89%(192/253)。

3. 血清 TB-Ab 检测结果：966 例患者行血清 TB-Ab 检测，其中肺结核组 678 例，非肺结核组 288 例。以临床诊断为金标准，TB-Ab 检测敏感度为 43.95%(298/678)，特异度为 78.82%(227/288)，阳性预测值为 83.01%(298/359)，阴性预测值为 37.40%(227/607)。

4. 联合检测的诊断价值：以肺结核临床诊断为金标准，评价各方法联合检测的诊断效能，任一种检测方法结果阳性则诊断为肺结核，联合检测结果均为阴性时，判断为阴性。3 种方法联合检测的敏感度为 93.14%(285/306)，特异度为 53.41%(47/88)；TB-Ab 和 SAT 联合检测的敏感度为 55.48%(238/429)，特异度为 87.64%(78/89)；T-SPOT. TB 和 TB-Ab 联合检测的敏感度为 92.83%(440/474)，特异度为 52.11%(148/284)；T-SPOT. TB 和 SAT 联合检测的敏感度为 88.89%(264/297)，特异度为 61.80%(55/89)，见表 1。654 例肺结核患者痰涂片抗酸杆菌检测阳性 197 例，敏感度为 30.12%(197/654)；所有非肺结核患者痰涂片抗酸杆菌检测均为阴性。绘制 ROC 曲线评价外周血 T-SPOT. TB、痰液 SAT、血清 TB-Ab 检测诊断肺结核的价值，各检测方法测得的曲线下面积(AUC)分别为：0.798、0.652、0.614。T-SPOT. TB + SAT + TB-Ab、T-SPOT. TB+SAT、T-SPOT. TB+TB-Ab、SAT + TB-Ab 检测的 AUC 分别为：0.865、0.826、0.843、0.732。

讨　论

早诊断和早治疗对于结核病防治至关重要，与传统的培养法相比，SAT 法检测各类临床标本中的结核分枝杆菌具有快速和敏感度高的优势[2-5]。van der Vliet 等[6]在 1994 年通过体外扩增 16S rRNA 进行分枝杆菌活性检测和药物敏感性试验(简称“药敏试验”)。试验证实 RNA 分子半衰期短，是结核分枝杆菌活菌的标志，可直接检测细菌活性，突出了活菌检测的价值和临床意义[2-3]，并且自然条件下 RNA 易降解，标本不易被污染。痰液 SAT 检测技术是针对结核分枝杆菌特有的 16S RNA 或 DNA 进行扩增，特异度高，不易出现假阳性。van der Vliet 等[6]报道，患者体内的结核分枝杆菌菌株可能

表 1　3 种检测技术不同联合检测方式对肺结核的诊断效能

联合检测方式	肺结核组(例)	非肺结核组(例)	敏感度(%)	特异度(%)
T-SPOT. TB+TB-Ab	474	284	92.83	52.11
阳性	440	136		
阴性	34	148		
T-SPOT. TB+SAT	297	89	88.89	61.80
阳性	264	34		
阴性	33	55		
TB-Ab+SAT	429	89	55.48	87.64
阳性	238	11		
阴性	191	78		
T-SPOT. TB+TB-Ab+SAT	306	88	93.14	53.41
阳性	285	41		
阴性	21	47		

注　联合检测时任一种方法检测结果阳性则判断为阳性，联合检测结果均为阴性时判断为阴性

为没有代谢活性的死菌，SAT 法可用于鉴定痰液中结核分枝杆菌是否为活菌，帮助观察疗效。倪丽丽等[7]提出，SAT 法扩增过程敏感度较高，当标本中结核分枝杆菌活力较差或存在扩增抑制因子，或者核酸抽提效率不高时可能出现假阴性，应在 SAT-TB 法检测体系中加入质控扩增体系，以更加有效地判断 SAT-TB 法阴性检测结果。当标本中菌量较少或细菌活力较差而导致其在培养基中无法生长时，因活菌中 16S RNA 拷贝数较 DNA 的拷贝数高，使得 SAT-TB 检测敏感度较以 DNA 为检测靶标的核酸扩增 PCR 荧光体外检测法的敏感度更高。本次研究结果显示，以肺结核临床诊断作为金标准，SAT-TB 法的敏感度为 30.43%，特异度为 100.00%，阳性预测值为 100.00%，阴性预测值为 77.75%，单独用于诊断肺结核时，具有一定的参考价值（AUC＝0.652）。本次研究结果中，SAT-TB 检测敏感度低于罗贤等[8]（59%）和 Cui 等[9]（67.6%）研究结果，可能与患者选择、送检痰液标本质量与存放送检条件限制等有关。

T-SPOT.TB 可检测外周血中结核分枝杆菌特异性释放 γ 干扰素的 T 细胞，与卡介苗无交叉免疫反应，但无法区分活动性结核病还是潜伏感染[10]。本研究结果显示，以肺结核临床诊断为金标准，T-SPOT.TB 检测敏感度最高（90.67%），但特异度（68.09%）较 SAT（100.00%）低，阳性预测值为 86.82%，阴性预测值为 75.89%；与潘丽萍等[11]的研究结果相近，略高于 Metcalfe 等[12]的 Meta 分析结果，即 T-SPOT.TB 在中低收入国家诊断肺结核的综合敏感度为 83%（95%*CI*：63%～94%），综合特异度为 61%（95%*CI*：40%～79%）。ROC 曲线分析显示 T-SPOT.TB 检测辅助诊断肺结核价值较高（AUC＝0.798）。潘丽萍等[11]也提出，相对于老年肺结核患者，T-SPOT.TB 对中青年肺结核患者有较好的辅助诊断价值。在其他研究中，Ferguson 等[13]、Escalante 等[14]、万荣等[15]等提出，T-SPOT.TB 在做血液透析患者、风湿性疾病患者，以及老年患者中筛查近期结核感染的敏感度、特异度、诊断符合率也都高于 TB-Ab 检测结果。

血清 TB-Ab 检测是目前临床开展最早、应用最广泛的快速检测方法。以肺结核临床诊断为金标准，血清 TB-Ab 检测敏感度较低（43.95%），特异度为 78.82%，与 SAT 检测及 T-SPOT.TB 检测比较，其敏感度和特异度均不高。

笔者进一步分析了 SAT、T-SPOT.TB、TB-Ab 等检测方法不同组合方式联合检测结核病的诊断价值。结果显示，敏感度及特异度均有不同程度提高，3 种方法联合检测时诊断价值最高（AUC＝0.865），T-SPOT.TB 联合 TB-Ab 检测的诊断价值次之（AUC＝0.843）。

参　考　文　献

[1] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南. 中华结核和呼吸杂志，2001，24(2)：70-74.

[2] Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Thorax, 2006, 61(9): 783-790.

[3] Sandin RL. Polymerase chain reaction and other amplification techniques in mycobacteriology. Clin Lab Med, 1996, 16(3): 617-639.

[4] Guerra RL, Baker JF, Alborz R, et al. Specimen dilution improves sensitivity of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for smear microscopy-positive respiratory specimens. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 314-316.

[5] Guerra RL, Hooper NM, Baker JF, et al. Use of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in a public health laboratory: test performance and impact on clinical care. Chest, 2007, 132(3): 946-951.

[6] van der Vliet GM, Schepers P, Schukkink RA, et al. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. Antimicrob Angents Chemother, 1994, 38(9): 1959-1965.

[7] 倪丽丽，罗柳林，景玲杰，等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值. 中华检验医学杂志，2012，35(8)：702-705.

[8] 罗贤，张腊红，洪理泉，等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核患者诊断中的应用. 中华实验和临床病毒学杂志，2015，29(2)：183-185.

[9] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 646-650.

[10] 石瑞如，张国龙. 抗原诱发的 γ-干扰素测定. 中国防痨杂志，2006，28(5)：317-320.

[11] 潘丽萍，贾红彦，刘菲，等. γ-干扰素释放试验对不同年龄组疑似肺结核的辅助诊断价值. 中华结核和呼吸杂志，2015，38(12)：892-896.

[12] Metcalfe JZ, Everett CK, Steingart KR, et al. Interferon-γ release assays for active pulmonary tuberculosis diagnosis in adults in low- and middle-income countries: systematic review and meta-analysis. J Infect Dis, 2011, 204 Suppl 4: S1120-S1129.

[13] Ferguson TW, Tangri N, Macdonald K, et al. The diagnostic accuracy of tests for latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. Transplantation, 2015, 99(5): 1084-1091.

[14] Escalante P, Kooda KJ, Khan R, et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection with T-SPOT(®).TB in a predominantly immigrant population with rheumatologic disorders. Lung, 2015, 193(1): 3-11.

[15] 万荣，李明武，赖明红，等. 结核感染 T 细胞斑点试验在老年肺结核中的诊断价值. 中国防痨杂志，2015，37(4)：348-352.

（收稿日期：2017-04-28）

（本文编辑：李敬文）