

文章编号 1006-8147(2015)04-0335-04

论著

结核 T 细胞斑点试验在结核性胸膜炎中的价值

庄妍, 赖雁平

(天津医科大学第二医院呼吸内科, 天津 300211)

摘要 目的:探讨结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)在鉴别诊断结核性胸膜炎和其他淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液中的价值。**方法:**对 63 例淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液患者(32 例结核性胸膜炎, 31 例非结核性胸膜炎)的外周血和胸腔积液单核细胞(PBMCs, PEMCs)进行 T-SPOT.TB 检测, 评价其敏感性、特异性, 并应用 ROC 曲线分析临界值。**结果:**结核性胸膜炎患者胸腔积液 T-SPOT.TB 的敏感性为 93.75%, 高于外周血的 90.63%, 但无统计学意义($\chi^2=0.21, P=0.641$); 特异性为 90.32%, 明显高于外周血的 67.74%($\chi^2=4.76, P=0.029$)。胸腔积液与外周血检测形成细胞数为 532.5(260.5~1053)SFCs/10⁶PEMC *vs* 166(43.5~349)SFCs/10⁶PBMC($P<0.05$)。胸腔积液的 ROC 曲线下面积为 0.964, 当取值分别为 12 和 133 SFCs/10⁶PEMC 时, 敏感性分别为 93.8%和 81.3%, 特异性为 90.3%和 96.8%。**结论:**胸腔积液 T-SPOT.TB 在结核性胸膜炎诊断中具有重要的参考价值, 当斑点数 ≥ 133 SFCs/10⁶PEMC 特异性较高。

关键词 结核性胸膜炎; 结核感染 T 细胞斑点试验; 外周血; 胸腔积液; 淋巴细胞; 渗出液

中图分类号 R521.7

文献标志码 A

T cell enzyme-linked immunospot tuberculous test for tuberculous pleurisy

ZHUANG Yan, LAI Yan-ping

(Department of Respiratory, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To investigate the application of mycobacterium tuberculosis T cell enzyme-linked immunospot tuberculous test (T-SPOT.TB) in the diagnosis of tuberculous pleurisy and lymphocyte-predominant pleural exudates. **Methods:** The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and pleural effusion mononuclear cells (PEMCs) were separated from 63 patients with lymphocyte-predominant pleural exudates (32 patients of tuberculous pleurisy and 31 patients of non-tuberculous pleurisy). Sensitivity and specificity were also detected. The optimum cut-off points acquired from the optimal sensitivity-specificity balance in the Receiver Operating Characteristic curves (ROC curves) were constructed. **Results:** In patients with tuberculous pleurisy, the sensitivity of T-SPOT.TB to pleural effusion was 93.75%, which was significantly higher than that to peripheral blood (90.63%) but no significant difference was found ($\chi^2=0.21, P=0.641$). The specificity of T-SPOT.TB to pleural effusion was 90.32%, which was higher than that to peripheral blood (67.74%), ($\chi^2=4.76, P=0.029$). The frequencies of specific T cells detected by T-SPOT.TB for pleural effusion were significantly higher than for peripheral blood [532.5(260.5-1053)SFCs/10⁶PEMC *vs* 166(43.5-349)SFCs/10⁶PBMC] ($P<0.05$). Taking 12 and 133 SFCs/10⁶PEMC as the cut-off value, the sensitivities, specificities and area under curve of T-SPOT.TB were 93.8% and 81.3%, 90.3% and 96.8%, and 0.964, respectively. **Conclusion:** The T-SPOT.TB assay of pleural effusion could have great importance for the diagnosis of tuberculous pleurisy, and it has higher specificity when the frequencies of specific T cells ≥ 133 SFCs/10⁶PEMC.

Key words tuberculous pleurisy; T cell enzyme-linked immunospot tuberculous test (T-SPOT.TB); peripheral blood; pleural effusion; lymphocyte; exudate

结核病大多表现为肺结核, 但仍有 15%~25% 的患者为淋巴结结核或结核性胸膜炎^[1]。该病临床症状多不典型, 确诊需在胸腔积液或胸膜组织中找到结核菌, 但结核菌培养的阳性率低, 培养周期长。应用胸膜活检也可以确诊, 但具有创伤性, 使其应用受限。目前外周血结核感染 T 细胞酶联免疫斑点试验(T-SPOT.TB)对于结核病的辅助诊断价值得到国内外的一致认同, 但胸腔积液 T-SPOT.TB 对结核

性胸膜炎的诊断价值仍存在争议。90%结核性胸膜炎表现为以淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液, 因此在临床工作中, 此检验结果多提示高度可疑结核性胸膜炎。本研究旨在探讨 T-SPOT.TB 对鉴别诊断结核性胸膜炎和其他淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液的价值。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2013 年 1 月-2014 年 4 月我院呼吸科收治的单侧胸腔积液患者 63 例, 其均符合淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液。渗出液的诊断标准参考 Light's 标准^[2], 即以下 3 项标准中符合任何

一项即可确诊为渗出液,均不符合则为漏出液:(1)胸液/血清蛋白(P/S Pro)>0.5;(2)胸液/血清乳酸脱氢酶(P/S LDH)>0.6;(3)胸液乳酸脱氢酶(PE LDH)大于正常血清乳酸脱氢酶上限的 2/3。淋巴细胞为主的诊断标准为胸腔积液细胞分类计数中淋巴细胞占有核细胞的比例>50%。全部病例中结核性胸膜炎患者 32 例,其中经病原学确诊(胸腔积液或胸膜活检组织培养出结核分枝杆菌)13 例,经组织学确诊(胸膜活检病理示干酪样肉芽肿)6 例,临床诊断^[3]13 例,且经抗结核治疗有效。非结核性胸膜炎患者 31 例,均已排除结核性胸膜炎,且明确诊断其他疾病,经治疗原发病有效。其中恶性胸腔积液 19 例(肺癌 16 例、乳腺癌 1 例、卵巢癌 1 例、淋巴瘤 1 例),肺炎旁胸腔积液 9 例,系统性红斑狼疮 1 例,类风湿性关节炎 1 例,肝硬化 1 例。入选者均签署知情同意书,且排除:<16 岁,孕妇,HIV 阳性,近 1 周内应用利尿剂,因肝病或严重营养不良所致低蛋白血症。

1.2 方法 采集所有患者(治疗前)外周静脉血 5 mL 和新鲜胸腔积液 50 mL,应用肝素抗凝管,室温保存,标本采集后 2 h 内送检,4 h 内完成检测。应用 T-SPOT.TB 试剂盒(英国,Oxford Immunotec 公司),标本经分离得到外周血单核细胞(PBMCs)和胸液单核细胞(PEMCs),制备成细胞悬液。在包被 γ -干扰素抗体的微孔板上,加入细胞培养液作为阴性对照,植物血凝素作为阳性对照,结核分枝杆菌特异性抗原—早期分泌靶向抗原 6 kD 和培养滤过蛋白

10 kD 作为刺激抗原。每孔加入细胞悬液,放在培养箱中培养 18~20 h,洗板后加入生物素标记的二抗,4 ℃反应 1 h,洗板后加入显色底物液,静置 7 min,去离子水终止反应。通过 T 淋巴细胞酶联免疫斑点系统记录斑点形成细胞数。结果判定:若阴性对照孔的斑点数<10,且阳性对照孔的斑点数>20,试验有效。若空白对照孔斑点数<6,且任一试验孔斑点数-空白对照孔斑点数 \geq 6,结果为阳性;当空白对照孔斑点数>6,且任一试验孔斑点数 \geq 2 \times 空白对照孔斑点数时,结果亦为阳性。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。敏感性=阳性例数/总例数,特异性=1-敏感性。所有数据均首先进行正态分布检验,符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行组间比较;非正态分布的计量资料用中位数 [四分位间距]表示,采用非参数秩和检验进行组间比较。两组间一般情况中的分类变量及反应率比较采用 χ^2 检验。绘制受试者工作特征(ROC)曲线对诊断价值进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试者基本情况及检验指标 表 1 列出了受试者的年龄、性别、近 1 月有无应用激素或免疫抑制剂、有无结核病史或影像学陈旧性肺结核改变、有无糖尿病、高血压等基础疾病及外周血和胸腔积液中的一些检验指标,其中结核性胸膜炎组胸液中的中性粒细胞比例较非结核性胸膜炎组高($P<0.05$)。

表 1 受试者基本情况及检验指标

Tab 1 General causes and physical examinations of subjects

组别	年龄/岁	性别 (男/女)	白蛋白/ (P/S)	LDH/ (P/S)	结核病史或 影像改变/ <i>n</i>	用免疫抑制 剂或激素/ <i>n</i>	糖尿病/ <i>n</i>	高血压/ <i>n</i>
结核性胸膜炎	47.66±15.25	18/14	0.61±0.12	1.89±1.44	6	4	8	7
非结核性胸膜炎	48.61±18.17	19/12	0.62±0.10	1.20±1.78	3	5	6	9
<i>P</i>	0.821	0.680	0.780	0.056	0.503	0.958	0.590	0.514

组别	外周血				胸液				
	白细胞数/ (10 ⁹ /L)	淋巴细胞 比例/%	白蛋白/ (g/L)	LDH/ (IU/L)	白细胞数/ (10 ⁹ /L)	淋巴细胞 比例/%	中性粒细胞 比例/%	白蛋白/ (g/L)	LDH/ (IU/L)
结核性胸膜炎	6.88±3.39	17.32±11.53	70.00±9.10	476±230	1.50±1.23	83.23±16.42	9.43±12.29	46.40±9.50	766±664
非结核性胸膜炎	7.71±4.98	17.94±9.36	69.20±8.40	654±472	1.40±1.36	85.26±13.85	4.21±5.74	43.70±9.60	545±528
<i>P</i>	0.472	0.824	0.416	0.059	0.742	0.690	0.034	0.426	0.078

2.2 T-SPOT.TB 测定 32 例结核性胸膜炎患者外周血 T-SPOT.TB 检测结果为 29 例阳性,3 例阴性,胸腔积液检测结果为 30 例阳性,2 例阴性。31 例非结核性胸膜炎患者外周血 T-SPOT.TB 检测结果为 10 例阳性,21 例阴性,胸腔积液检测结果

为 3 例阳性,28 例阴性。胸腔积液检测的敏感性高于外周血,但无统计学意义($P>0.05$);其特异性明显高于外周血($P<0.05$)。胸腔积液释放 γ -干扰素的特异性 T 细胞数显著高于外周血($P<0.05$)。见表 2。

表2 外周血与胸腔积液的T-SPOT.TB检测结果

Tab 2 The data of serum and pleural T-SPOT.TB

样品	敏感性/%	特异性/%	特异性T细胞数 (SFCs/10 ⁶ PBMC 或 SFCs/10 ⁶ PEMC)
外周血	90.63	67.74	166(43.5~349)
胸腔积液	93.75	90.32	532.5(260.5~1053)
χ^2	0.21	4.76	
P	0.641	0.029	<0.05

2.3 绘制 ROC 曲线 在 63 例胸腔积液患者中,以病原学/组织学或临床诊断作为确定结核性胸膜炎的标准,以释放 γ -干扰素的特异性 T 细胞数为标准绘制 ROC 曲线,见图 1。外周血的 ROC 曲线下面积为 0.880,当取值分别为 21 和 75 SFCs/10⁶PBMC 时,敏感性分别为 81.3%和 65.6%,特异性为 77.4%和 96.8%。胸腔积液的 ROC 曲线下面积为 0.964,当取值分别为 12 和 133 SFCs/10⁶PEMC 时,敏感性分别为 93.8%和 81.3%,特异性为 90.3%和 96.8%。

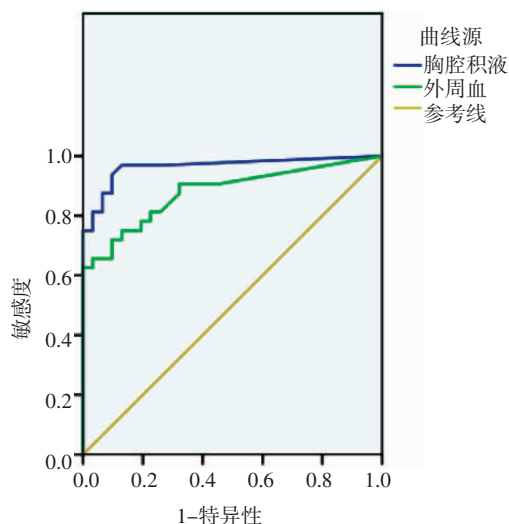


图1 外周血及胸腔积液T-SPOT.TB的ROC曲线

Fig 1 ROC curve of serum and pleural T-SPOT.TB

3 讨论

结核杆菌感染产生以细胞介导为主的免疫反应,T淋巴细胞在初次感染致敏后成为记忆T细胞在体内长期存在,当再次接触结核杆菌时活化增殖为效应T细胞,释放多种细胞因子,其中由辅助T淋巴细胞(CD4⁺/CD8⁺)产生的 γ -干扰素是最为关键的细胞因子^[4-5]。T-SPOT.TB以早期分泌靶向抗原6 kD和培养滤过蛋白10 kD为特异性抗原,刺激从外周血或体液分离的单核细胞产生 γ -干扰素,再通过酶联免疫斑点技术计数特异性T细胞数目。这些特异性抗原由RD1基因区所编码,该区域仅存在于结核分枝杆菌和少数致病性分枝杆菌的基因组中,

不存在于非致病性分枝杆菌属和卡介苗疫苗株中,且两种抗原联合检测针对不同表位进行反应,从理论上保证了T-SPOT.TB的高敏感性和特异性。但在结核病流行地区,外周血T-SPOT.TB的特异性较低,为67.0%~90.5%^[6-7],这是由于结核疫区存在较多的潜伏感染患者所致。理论上活动性结核感染的T-SPOT.TB的斑点数应较潜伏性感染更多,但事实并非如此,其可能的原因:当潜伏性结核感染者的免疫功能良好时,少量抗原刺激就能激发出活跃的免疫反应;或者当活动性结核患者免疫功能低下时,大量抗原刺激也不足以激起有效的免疫反应。在此种背景下,选择特异性较高的临界值,比根据ROC曲线确定的最佳临界值更有意义^[8]。作为临床医生,需要在不同的临床背景下选择对于实际工作最理想的临界值。正如本研究所示,在外周血及胸液临界值分别取值75 SFCs/10⁶PBMC和133 SFCs/10⁶PEMC时,其特异性较高。在肺外结核中,结核抗原特异性效应T细胞迅速增殖,并被募集到感染部位,病变局部呈免疫病理学的隔室化反应^[9],故外周血中的效应T细胞减少,感染部位的效应T细胞增多,因此理论上认为对感染部位进行T-SPOT.TB检测有可能获得更高的敏感性和特异性。目前有学者认为T-SPOT.TB的检测范围已不仅局限于外周血,还可应用于痰液、胸水、腹水及脑脊液等^[10-11]。但对于胸腔积液T-SPOT.TB的研究结果仍存在争议,有些学者认为其对结核性胸膜炎的诊断价值高于外周血^[12-13],有些则认为其不确定因素较多,结果不尽人意^[8]。而我们的研究认为胸液T-SPOT.TB的敏感性、特异性均高于外周血。

结核性胸膜炎是结核分枝杆菌及代谢产物直接侵及胸膜引起的胸膜炎症,多表现为淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液。在临床工作中,肺炎旁胸腔积液、脓胸的患者通常表现为高热、严重感染症状、血象升高,胸腔积液为脓性或中性粒细胞为主,与结核性胸膜炎鉴别诊断较容易。但仍有17%的结核性胸膜炎的胸腔积液中淋巴细胞比例<50%,本研究只讨论了淋巴细胞为主的渗出性胸腔积液中T-SPOT.TB的诊断价值,而以中性粒细胞为主的渗出液未在研究范围之内。此外,本研究通过Light's标准判定渗出性胸腔积液,但应用利尿剂可以将一部分漏出液错误地判断为渗出液,且低蛋白血症亦可能影响渗出液的判定,因此本研究将近1周内应用利尿剂及各种原因所致的低蛋白血症患者作为排除标准。目前国内对于T-SPOT.TB的研究样本量均偏小,本研究同样存在此问题,尚需在今后的研究

中扩大样本量;另外,最终诊断为结核性胸膜炎的个别病例通过临床确诊,可能会影响结果的严谨性,但若将临床确诊病例全部排除,只研究微生物或病理确诊病例,可能仍不可避免地造成结论存在一定偏差。

最终,我们的研究得到以下两个主要结论:一是胸液 T-SPOT.TB 是较好的诊断结核性胸膜炎的指标;二是当胸液 T-SPOT.TB 斑点数 ≥ 133 SFCs/ 10^6 PEMC 时具有较高的诊断特异性。

参考文献:

- [1] Porcel J M. Tuberculous pleural effusion[J]. Lung, 2009, 187(5): 263
- [2] Light R W, Macgregor M I, Luchsinger P C, et al. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates[J]. Ann Intern Med, 1972, 77(4): 507
- [3] 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2): 5
- [4] Chiappini E, Della B C, Bonsignori F, et al. Potential role of M tuberculosis specific IFN- γ and IL-2 ELISPOT assays in discriminating children with active or latent tuberculosis[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e46041
- [5] Singh A, Dey A B, Mohan A, et al. Foxp3(+) regulatory T cells among tuberculosis patients: impact on prognosis and restoration of antigen specific IFN- γ producing T cells [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44728
- [6] Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon- γ release assay for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur Respir J, 2011, 37(1): 100
- [7] Krenke R, Korczynski P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis[J]. Curr Opin Pulm Med, 2010, 16(4): 367
- [8] Keng L T, Shu C C, Chen J Y, et al. Evaluating pleural ADA, ADA2, IFN- γ and IGRA for diagnosing tuberculous pleurisy[J]. J Infect, 2013, 67(4): 294
- [9] 任卫聪, 裴理会, 姜晓颖, 等. γ -干扰素诱导蛋白 10 在结核性胸膜炎辅助诊断中的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(2): 108
- [10] Cho O H, Park K H, Kim S M, et al. Diagnostic performance of T-SPOT.TB for extrapulmonary tuberculosis according to the site of infection[J]. J Infect, 2011, 63(5): 362
- [11] Nkurunungi G, Lutangira J E, Lule S A, et al. Determining mycobacterium tuberculosis infection among BCG-immunised ugandan children by T-SPOT.TB and tuberculin skin testing [J]. PLoS One, 2012, 7(10): 47340
- [12] Soysal A, Toprak D, Koc M, et al. Diagnosing latent tuberculosis infection in haemodialysis patients: T-cell based assay (T-SPOT.TB) or tuberculin skin test[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012, 27(4): 1645
- [13] Feske M L, Medina M, Graviss E A, et al. IL-7 addition increases spot size and number as measured by T-SPOT.TB[J]. Methods Mol Biol, 2012, 792: 229

(2014-10-23 收稿)

文章编号 1006-8147(2015)04-0338-04

论 著

71 例原发性甲状旁腺功能亢进诊治及 PTH、Ca 分析

张 萌, 田伟军

(天津医科大学总医院普通外科, 天津 300052)

摘要 目的: 总结原发性甲状旁腺功能亢进的诊治体会, 分析围手术期甲状旁腺激素(PTH)、血钙(Ca)变化。方法: 回顾性分析原发性甲状旁腺功能亢进 71 例患者临床资料。结果: 71 例患者, PTH 升高者占 100.0%, Ca 升高占 94.4%, 血磷降低占 58.9%; 病灶检出率 B 超为 86.0%, CT 增强为 93.8%, ^{99m}Tc -MIBI 为 95.2%; 术前、切皮前、肿物切除前、切除即刻、切除后 10、15、30 min 及术后 1、2、3 d PTH 为 (86.51 ± 78.29) 、 (99.84 ± 104.33) 、 (113.06 ± 86.73) 、 (41.39 ± 37.70) 、 (11.10 ± 10.22) 、 (10.43 ± 9.29) 、 (5.87 ± 8.23) 、 (3.25 ± 6.14) 、 (3.70 ± 3.48) 、 (7.74 ± 3.71) pmol/L; 术前、术后当天及 1、2、3、4 d 血钙为 (2.88 ± 0.34) 、 (2.56 ± 0.37) 、 (2.27 ± 0.27) 、 (2.17 ± 0.26) 、 (2.09 ± 0.21) 、 (2.00 ± 0.25) mmol/L; 术后低钙血症发生率为 75.4%, 骨型比例为 84.6%。结论: 原发性甲状旁腺功能亢进诊治需综合运用各影像学检查, 术中肿物切除后 10 min PTH 的变化明显, 适宜作为监测指标, 术后 2 d 内低钙血症发生率高, 需重视治疗。

关键词 原发性甲状旁腺功能亢进; 甲状旁腺肿瘤; 甲状旁腺激素; 血钙

中图分类号 R653

文献标志码 A

原发性甲状旁腺功能亢进 (primary hyperparathyroidism, PHPT) 是由于甲状旁腺腺瘤、增生、腺癌等引起的甲状旁腺激素 (parathyroid hormone,

作者简介 张萌 (1989-), 男, 硕士在读, 研究方向: 肝胆外科、内分泌外科; 通信作者: 田伟军, E-mail: jonathontian@163.com。

PTH) 分泌过多, 造成钙磷代谢紊乱, 继而引起全身多脏器病变的内分泌疾病。随着检验水平和重视程度的提高, 发病率逐年升高, 但很多方面诊治欠规范, 且国内尚无围手术期血 PTH、血钙 (Ca) 具体数值变化的分析。现回顾性分析 71 例 PHPT 患者的临