

·论 著·

## T淋巴亚群及T-SPOT.TB检测对活动性结核病的鉴别诊断

罗丹,潘建华

长沙市中心医院,湖南 长沙 410004

**摘要:**目的 探讨T淋巴细胞亚群及结核感染T细胞斑点试验(T-SPOT.TB)检测对活动性结核病的鉴别诊断价值。方法 检测20例健康对照组、26例隐性结核病患者及35例活动性结核杆菌感染者外周血的T淋巴细胞亚群及T-SPOT.TB。结果 隐性感染组、活动性结核组的CD4<sup>+</sup>细胞、CD8<sup>+</sup>细胞的表达与健康对照组比较有显著性差异( $P$ 均 $<0.01$ ),而隐性感染组与活动性结核组间比较无显著性差异( $P>0.05$ )。外周血的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞、CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞在健康对照组、隐性感染组及活动性结核组中表达有显著性差异( $P$ 均 $<0.01$ );T-SPOT.TB诊断隐性感染组的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比分别是53.8%(14/26)、90.0%(18/20)、87.5%(14/16)、60.0%(18/28)、5.4、0.5;而活动性结核组分别是57.1%(20/35)、90.0%(18/20)、90.9%(20/22)、54.5%(18/33)、5.7、0.5,二组在诊断效率指标上无显著性差异( $P>0.05$ )。结论 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞与CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞在活动性结核与隐性结核的表达差异或与免疫抑制和免疫耐受的强度有关,是区分二者的优选指标。

**关键词:**活动性结核;隐性结核感染;T细胞亚群;T细胞斑点试验

**中图分类号:**R521.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2015)04-393-04

Value of detection of T lymphocyte subsets and T-SPOT.TB assay in diagnosis  
of active tuberculosis

LUO Dan, PAN Jian-hua

*Department of Clinical Laboratory, Changsha Municipal Central Hospital, Changsha 410004, Hunan, P.R.China*

**Abstract:** Objective To study the value of detection of T lymphocyte subsets and T-SPOT.TB assay in diagnosis of active tuberculosis. Methods Flow cytometry was applied to detect the expression percentage of peripheral blood T lymphocyte subsets and T-SPOT.TB in healthy people (healthy control group,  $n=20$ ), the latent tuberculosis patients (latent infection group,  $n=26$ ) and active tuberculosis patients (active tuberculosis group,  $n=35$ ). Results The expression rates of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells between the active tuberculosis group, the latent infection group and the healthy control group were statistically significantly different ( $P<0.01$ ). The expression rates of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells between the active tuberculosis group and the latent infection group were not statistically significantly different ( $P>0.01$ ). The expression rates of CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> T cells among the active tuberculosis group, the latent infection group and the healthy control group were statistically significantly different ( $P<0.01$ ). The sensitivity, the specificity, the positive predictive value, negative predictive value, the positive likelihood ratio and the negative likelihood ratio of blood T-SPOT.TB in the latent infection group was respectively 53.8% (14/26), 90.0% (18/20), 87.5% (14/16), 60.0% (18/28), 5.4, 0.5 and that in the active tuberculosis group were 57.1% (20/35), 90.0% (18/20), 90.9% (20/22), 54.5% (18/33), 5.7, 0.5 respectively. The evaluation of diagnostic efficiency of clinical indicators of blood T-SPOT.TB were not statistically significant different between the active tuberculosis group and the latent infection group ( $P>0.05$ ). Conclusion The significant differences in expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> cells and CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> cells between the latent tuberculosis infection and active tuberculosis groups might be related to the intensity of the immunosuppression and immune tolerance, and that may be the two optimized indicators for differentiating the two.

**Key words:** Active tuberculosis; Latent tuberculosis infection; T lymphocyte subsets; T-SPOT.TB

全球约有1/3人口感染结核,最终约5%~10%的发展成为活动性结核(Active tuberculosis),而大部分人成为隐性结核感染者(Latent tuberculosis infection, LTBI)<sup>[1]</sup>。研究表明,预防性治疗后LTBI后续发病风险降低90%左右<sup>[2]</sup>,因此,筛查和诊断LTBI对结核病防控有着关键作用<sup>[3]</sup>。本研究通过观察活动性结核和

隐性结核感染者的外周血T淋巴细胞亚群表达水平变化及T-SPOT.TB试验,以期能有效地识别隐性结核感染者,为临床的免疫干预提供充足的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 对象资料 将病例资料依据结核患者是否具

基金项目:国家“十二五”重大专项(No.2013ZX10005004)

作者简介:罗丹(1979~),男,硕士,主管技师,研究方向:临床免疫学。

有活动性分为二组即活动性结核组和隐性感染组,并设立健康对照组,共三个组别。活动性结核组选择2013年9月至2014年6月间在长沙市中心医院肺科医院住院的35例肺结核患者,全部确诊为活动性肺结核,且痰涂片阳性,确诊标准为《结核病诊断及分类(WS288-2008)》<sup>[4]</sup>,排除HIV感染、自身免疫反应性疾病、肿瘤、病毒感染、血液病等影响结果判定者,患者年龄11~52岁,平均(30.0±9.3)岁。隐性感染组入选26例病例,入组标准以美国CDC发布LTBI诊断指南<sup>[5]</sup>为蓝本,如近期与涂片阳性者有密切接触;新近感染,结核菌素皮肤试验(TST)由阴性转为强阳性;胸部影相学显示异常。健康对照组入选医院体检科各项指标正常的健康人群20人,男女各10人,年龄17~41岁,平均(25.3±7.1)岁。三组研究对象在性别、年龄等差异均无统计学意义,入选前三个月内未使用免疫制剂。

1.1.2 仪器和试剂 采用BECKMAN COULTER EpicsX流式细胞仪;荧光抗体CD39<sup>+</sup>-PerCP、CD4<sup>+</sup>-FITC、CD25<sup>+</sup>-PE-Cy7、CD127<sup>low</sup>-PE试剂盒购自Pharmingen公司;T-SPOT.TB检测试剂盒购自Oxford Immunotec Ltd;RPMI-1640及人外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 T细胞亚群检测 先在流式细胞检测管加入10μL CD39<sup>+</sup>-PerCP、CD4<sup>+</sup>-FITC、CD25<sup>+</sup>-PE-Cy7、CD127<sup>low</sup>-PE荧光抗体,再加入100μL抗凝全血,充分混匀,常温避光染色20min,裂解红细胞,离心弃上清液,用磷酸盐缓冲液洗涤后,重悬细胞,上机检测,获取细胞数不少于15 000个,操作步照参考试剂盒提供的方法。应用BECKMAN COULTER公司配套软件分析目的T淋巴细胞亚群。

1.2.2 T-SPOT.TB检测 将5mL肝素抗凝血分成二份,分别按1:1和1:2的比例加入RPMI-1640和Ficoll淋巴细胞分离液,将RPMI-1640稀释后的血样缓慢轻倒入Ficoll细胞液上。将混合物分别以1 000g、

600g、350g离心力离心三次,每次7 min,倒掉上清液后加入500μL AIM-V培养液配制成细胞液。分别在T-SPOT.TB板的阴性对照、抗原A、抗原B及阳性对照孔中加入100μL细胞液,5%CO<sub>2</sub>培养箱中37℃培养16~20h。次日,用200μL PBS洗板4次后,每孔加50μL酶结合物,4~8℃孵育1h。PBS洗涤4次每孔加50μL显色液,暗处静置7min,加蒸馏水终止反应。37℃烘箱内干燥4h,计算和处理结果,操作步照参考试剂盒提供的方法。

1.3 统计学处理 应用SPSS17.0统计软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,三组T淋巴细胞免疫学指标比较采用完全随机设计资料的方差分析,不同组间的比较采用SNK检验, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞的表达 经流式细胞仪检测CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞。CD4<sup>+</sup>T细胞表达率在三个组比较差异有统计学意义( $F=5.39, P < 0.01$ );活动性结核组和隐性感染组较正常对照组比较有统计学意义( $Q=6.22, Q=5.41, P < 0.01$ ),但活动性结核组和隐性感染组组间比较无显著性差异( $Q=0.81, P > 0.01$ )。CD8<sup>+</sup>T细胞的数量在活动性结核组和隐性感染组及正常对照组间无差异( $F=1.21, P > 0.01$ )。CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>在结核病中的比值较正常对照组有所降低,但三组间并无显著性差异( $F=0.87, P > 0.01$ ),见表1。

2.2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>T细胞的表达 正常对照组、隐性感染组及活动性结核组外周血的T调节细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>)依次增多。三组间采用完全随机设计资料的方差分析,组间比较差异有统计学意义( $F=163.704, P < 0.01$ )。进一步进行两两比较的SNK检验显示,隐性感染组和活动性结核组差异有统计学意义( $Q=5.11, P < 0.01$ ),见表1。

2.3 CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>T细胞的表达 CD39<sup>+</sup>T调节细胞(CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>)在活动性结核组的数量较其它二组明显增多,隐性感染组

表1 三组T淋巴亚群比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of three T lymphocyte subsets( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	例数 No.case	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> /CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> (%)	CD39 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup> / CD4 <sup>+</sup> (%)
正常对照组 Healthy control group	20	42.52±4.33	29.90±5.99	1.51±0.84	4.84±0.85	3.24±0.60
隐性感染组 Latent infection group	26	33.48±5.27	32.76±6.41	1.43±1.01	6.95±0.64	4.88±0.54
活动性结核组 Active tuberculosis group	35	32.13±4.98	33.51±7.35	1.39±0.79	9.49±1.14	7.48±0.83

略高于正常组。三组间采用完全随机设计资料的方差分析,组间比较( $F=261.57, P<0.01$ )。进一步进行两两比较的SNK 检验显示,隐性感染组和活动性结核组差异有统计学意义( $Q=9.21, P<0.01$ ),见表1。

2.4  $\gamma$ 干扰素释放试验 T-SPOT.TB检测板条结果如图1,由刺激抗原CFP-10及ESAT-6产生的细胞斑点如图2。活动性结核组阳性率为57.1%(20/35),高于隐性感染组53.8%(14/26),但二者差异无统计学意

义( $\chi^2=0.28, P>0.05$ )。活动性感染组的特异性、阳性预测值、阴性预测组、阳性似然比、阴性似然比分别为90.0%、90.9%、54.5%、5.7、0.5,而隐性感染组分别为90.0%、87.5%、60.0%、5.4、0.5,二组在各诊断指标上差异无统计学意义( $\chi^2=0.01, P>0.05$ )。T-SPOT.TB的各诊断效率指标不能有效的区分活动性结核和隐性感染,见表2。

表2 二组T-SPOT.TB 诊断效率指标比较

Table 2 Comparison of value of T-SPOT.TB in diagnosis of the latent tuberculosis and the active tuberculosis

组别 Group	例数 No.case	敏感度 (%) Sensitivity	特异度(%) Specificity	阳性预测值(%) Positive predictive value	阴性预测值(%) Negative predictive value	阳性似然比 Positive likelihood ratio	阴性似然比 Negative likelihood ratio
隐性感染组 Latent infection group	26	53.8(14/26)	90.0(18/20)	87.5(14/16)	60.0(18/28)	5.4	0.5
活动性结核组 Active tuberculosis group	35	57.1(20/35)	90.0(18/20)	90.9(20/22)	54.5(18/33)	5.7	0.5

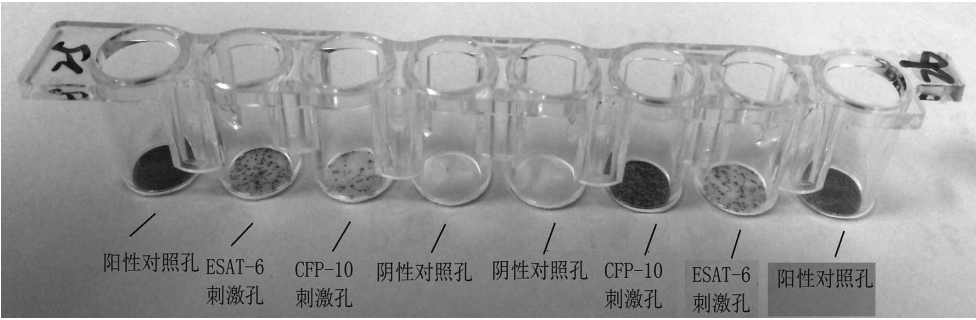


图1 T-SPOT.TB检测板结果

Fig.1 Results of T-SPOT.TB test

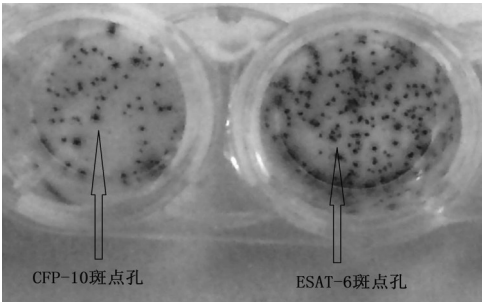


图2 刺激抗原产生的细胞斑点

Fig.2 Cells spots of the stimulated antigen

3 讨论

结核病的发病机制十分复杂,且不是一成不变的。结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染机体后,被巨噬细胞吞噬入胞,胞内的溶酶体、抗菌肽等杀伤,同时其暴露的毒性物质亦激活巨噬细胞产生细胞因子和趋化因子等诱导天然免疫、获得性免疫及细胞凋亡共同杀伤MTB。但MTB也通过多种方式逃逸机体的杀伤,在巨噬细胞内存活下来,造成机体的

隐性感染,这些方式如抑制吞噬小体酸化和溶酶体形成及巨噬细胞的凋亡、改变巨噬细胞的摄取、干扰巨噬细胞抗原递呈、逃避ROS、RNS毒性效应等<sup>[6-7]</sup>。

结核特异性免疫中CD4<sup>+</sup>T细胞扮演着重要角色,其递呈MTB抗原,激活和趋化巨噬细胞使机体发生免疫应答杀灭MTB,分泌INF- $\gamma$ 、IL-2等细胞因子抑制巨噬细胞内MTB的生长。同时,记忆性CD4<sup>+</sup>T细胞对MTB的再次侵入起积极地保护作用<sup>[8]</sup>。CD8<sup>+</sup>T细胞作为细胞毒性T淋巴细胞,通过颗粒胞吐发挥效应,通过介导穿孔素、颗粒素等细胞毒性分子,协助CD4<sup>+</sup>T细胞溶解靶细胞,使感染的细胞凋亡。此外,CD8<sup>+</sup>T细胞通过诱导分泌INF- $\gamma$ 等应答实现对机体的保护性免疫<sup>[9]</sup>。本研究中,CD4<sup>+</sup>T细胞水平在结核病组降低,表明机体免疫功能受损。CD8<sup>+</sup>T细胞在水平结核病组中增加,表明机体保护性免疫有所增强。但CD4<sup>+</sup>T细胞及CD8<sup>+</sup>T细胞在活动性结核组与隐性感染结核组中表达却无差异,这两项指标不能作为评估结



核病的活动性状态。

$\gamma$ 干扰素释放试验(Interferon gamma release assays, IGRAs),是近年来发展起来的检测抗原特异性T细胞的方法,是以RDI编码的结核特异性抗原6kD早期靶向抗原(early antigen target-6, ESAT-6)和10kD培养滤过蛋白(culture filtrate protein-10, CFP-10)肽段库为刺激原,检测外周血中结核特异性释放 $\gamma$ 干扰素的T淋巴细胞,以诊断结核。T-SPOT.TB实验结果清晰,易于判断,先后在欧洲、加拿大、美国等地获批准用于临床。本研究中T-SPOT.TB诊断结核虽然有较高的特异度和阳性预测值,但敏感度和阴性预测值却较低,且其在活动性结核组与隐性感染结核组诊断效率无差异。国内外的一些报道称<sup>[10]</sup>,利用ROC曲线分析出活动性结核与隐性感染结核的分界值斑点数,借以区分二者,虽然有可接受的敏感度和特异性,但交叉重叠区域过大,而无法有效的应用于临床。

CD4<sup>+</sup>Treg细胞诱导Th1、Th2等多种细胞产生肿瘤生长因子 $\beta$ 等缓冲炎症反应,同时通过细胞-细胞直接接触抑制、抑制性细胞因子的分泌、白介素-2的清除等发挥免疫抑制,实现对机体的免疫保护和免疫调节功能。本研究中,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>T细胞的数量在健康人群组、隐性感染组和活动性感染组依次增多,且有显著性差异。负性调节的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>T细胞增多说明机体的免疫应答强烈,结核病情严重。

CD39是淋巴细胞表面一类分子标记物,能使细胞外ATP、ADP水解为AMP。CD39表达在具有记忆活化的调节T细胞、内皮细胞、单核细胞、树突状细胞、朗格汉斯细胞、NK细胞、自然杀伤T细胞等<sup>[11]</sup>,其表达在CD4<sup>+</sup>Treg上的细胞不仅能产生腺苷发挥抑制作用,还能促进其进入炎性组织、并增强在炎性环境中的生存能力。本研究中CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞在活动性结核病中表达明显多于隐性感染组和正常对照组,且有显著性差异,这与国外的报道一致<sup>[12]</sup>。CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞在活动性结核病中,对维持免疫抑制和免疫耐受有着极其重要的作用,也能作为区分活动性结核和隐性感染的指标。

对LTBI进行预防性治疗是被证实防止结核病发生的有效途径,在许多发达国家已作为国家结核病控制规划的重要措施。识别、判定LTBI是预防性用药和针对性治疗的前提。CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T细胞虽然由于

结核的病情严重及病程在细胞数上发生变化,但不能据此区别LTBI与活动性结核病。淋巴细胞的免疫反应性会因结核杆菌的感染而发生变化,但因个体差异,而使T-SPOT.TB试验结果不能鉴别结核的类型。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞与CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞能鉴别活动性结核与隐性结核感染,二者在表达上的差异或与免疫抑制和免疫耐受的强度有关,尤其是CD39<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>细胞,更是区分活动性结核与隐性结核感染的优选指标。

## 参考文献

- [1] Barry CE 3<sup>rd</sup>, Boshoff HI, Dariois V, Dick T, Ehri S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ, Young D, The spectrum of latent tuberculosis; rethinking the biology and intervention strategies[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(12):845-855.
- [2] Richeldi L, An update on the diagnosis of tuberculosis infection[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(7):736-742.
- [3] 刘二勇, 周林, 成诗明. 结核分枝杆菌潜伏性感染及预防性治疗研究进展的系统评价[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(1):231-239.
- [4] 中华医学会, 临床诊疗手册(结核分册)[M]. 北京: 人民出版社, 2005:9.
- [5] United States Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention. Latent tuberculosis infection: a guide for primary health care providers [DB/OL]. Atlanta: United States Centers for Disease Control and Prevention, 2010(2010-11-21)[2012-11-16].
- [6] Stokes RW, Waddell SJ. Adjusting to a new home Mycobacterium tuberculosis gene expression in response to an intracellular lifestyle[J]. Future Microbiol, 2009, 4(10):1317-1335.
- [7] Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis[J]. Clin Dev Immunol, 2011:405310.
- [8] O'Garra A, Redford P S, McNab F W, et al. The Immune Response in Tuberculosis [J]. Annu Rev Immunol, 2013, 31:474-527.
- [9] Axelsson-Robertson R, Loxton AG, Walzl G, et al. A Broad Profile of Co-Dominant Epitopes Shapes the Peripheral Mycobacterium tuberculosis [J]. PLoS One, 2013, 8(3):58309-58309.
- [10] 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.
- [11] Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, et al. CD39/NPTase-1 activity and expression in normal leukocytes[J]. Thromb Res, 2007, 121:309-317.
- [12] Kim K, Perera R, Tan DB, et al. Circulating mycobacterial-reactive CD4<sup>+</sup> T cells with an immunosuppressive phenotype are higher in active tuberculosis than latent tuberculosis infection[J]. Tuberculosis, 2014, 94(5):494-501.

收稿日期:2015-01-21 编辑:符式刚