

胸水 ADA 和 TB-DNA 联合检测对结核性胸腔积液的诊断

周晓宇, 李伟, 陈余清

蚌埠医学院第一附属医院呼吸与危重症医学科, 安徽 蚌埠 233000

摘要: **目的** 探讨胸水中腺苷脱氢酶(ADA)、结核分枝杆菌(TB) DNA 的联合检测对结核性胸腔积液的诊断价值。**方法** 采集 2015 年 1 月至 2018 年 1 月入住蚌埠医学院第一附属医院呼吸科的 102 例胸腔积液患者的胸水标本,运用全自动生化分析仪测定 ADA,以 ADA >40 U/L 为阳性;全自动荧光定量检测 TB-DNA,将 TB-DNA >500 拷贝作为阳性标准。比较胸水 ADA、TB-DNA 单一检测和联合检测的诊断效能。**结果** ADA 检测结果的 $Kappa = 0.782$, TB-DNA 检测结果的 $Kappa = 0.165$, ADA + TB-DNA 检测结果的 $Kappa = 0.822$,提示 ADA + TB-DNA 联合诊断一致性最好,且与最终诊断符合程度较高。ADA + TB-DNA 联合诊断灵敏度为 91.3%,特异度为 91.1%,准确度为 91.2%。结核性胸腔积液与恶性胸腔积液患者性别比较无统计学差异($P > 0.05$);结核性胸腔积液患者 ADA 值显著高于恶性胸腔积液患者,年龄显著低于恶性胸腔积液患者(P 均 < 0.01)。**结论** 胸水中 ADA、TB-DNA 的联合检测有助于结核性胸腔积液的诊断。

关键词: 腺苷脱氢酶; 结核分枝杆菌 DNA; 结核性胸腔积液; 联合诊断; 敏感性; 特异性

中图分类号: R 521.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2018)08-1098-04

Combined detection of adenosine deaminase and mycobacterium tuberculosis DNA in hydrothorax for the diagnosis of tuberculous pleural effusion

ZHOU Xiao-yu, LI Wei, CHEN Yu-qing

Department of Pulmonary Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233000, China

Corresponding author: CHEN Yu-qing, E-mail: bbmccyq@126.com

Abstract: Objective To investigate the diagnosis value of combined detection of adenosine deaminase (ADA) and mycobacterium tuberculosis (TB) DNA in hydrothorax for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. **Methods** The samples of 102 patients with pleural effusion who received treatment at The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College from January 2015 to January 2018 were collected. Full-automatic biochemical analyzer was used to detected ADA (ADA >40 U/L as a positive standard) and real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect TB-DNA (TB-DNA >500 copy as a positive standard). The diagnostic efficiency were compared with single and combined detection of ADA and TB-DNA in pleural fluid. **Results** The diagnostic agreement result of ADA, TB-DNA and ADA plus TB-DNA was $Kappa = 0.782$, $Kappa = 0.165$, $Kappa = 0.822$ respectively, which showed that ADA combined with TB-DNA had best diagnostic agreement and it had a good compliance degree with the final diagnosis. The sensitivity, specificity and accuracy of ADA and TB-DNA combined detection was 91.3%, 91.1% and 91.2% respectively. There was no significant difference in gender between tuberculous pleural effusion patients and malignant pleural effusion patients ($P > 0.05$). Compared with malignant pleural effusion patients, tuberculous pleural effusion patients had a higher ADA value and lower age (all $P < 0.01$). **Conclusion** The combined detection of ADA and TB-DNA in pleural fluid is helpful to the diagnosis of tuberculous pleural effusion.

Key words: Adenosine deaminase; Mycobacterium tuberculosis DNA; Tuberculous pleural effusion; Combined detection; Sensitivity; Specificity

2014 年,世界卫生组织估计新发结核约 960 万,死亡 1.5 万。结核性胸腔积液是最主要的肺外结核,约占所有结核患者的 3%~25%。近年来,由于对结核病的早期诊断和及时治疗,活动性结核的发病率逐渐下降,但结核性胸腔积液的发生率很高,且可能产生严重的并发症及后遗症。因此早期对结核性胸腔积液的诊断尤其重要。传统的结核性胸腔积液诊断如胸水的涂片检测抗酸杆菌或结核杆菌培养的阳性率低^[1],临床诊断价值较低;胸膜活检阳性率相对较高,但存在创伤大、并发症多等风险,且需要专业技术人员操作,不宜普及。因此探讨一种快速、准确、简单的方法对结核性胸腔积液的诊断十分重要。一直以来,胸水腺苷脱氢酶(ADA)检测被视为诊断结核性胸腔积液的标志物,具有较高的敏感性及特异度;近年来,利用 PCR 技术检测胸水中结核分枝杆菌(TB)-DNA 的方法被认可,对胸水培养阴性的结核性胸腔积液诊断有重要价值。本文通过对确诊为结核性胸腔积液的患者胸水中 ADA 及 TB-DNA 的检测,来研究其对结核性胸腔积液的诊断意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 1 月至 2018 年 1 月入住蚌埠医学院第一附属医院呼吸科的胸腔积液患者 102 例,所有患者均通过胸腔穿刺术胸腔积液常规检查及 B 超引导下或胸腔镜下胸膜活检确诊。其中诊断结核性胸腔积液 46 例,男 27 例,女 19 例;非结核胸腔积液 56 例,男 33 例,女 23 例,包括:恶性 41 例(男 22 例,女 19 例),心功能衰竭 6 例(男 4 例,女 2 例),肺炎旁积液 4 例(男 3 例,女 1 例),脓胸 3 例(均为男性),胸膜间皮瘤 1 例(男),胸腺瘤 1 例(女)。结核性胸腔积液诊断标准:(1)胸膜活检病理提示干酪性肉芽肿;(2)胸水涂片查到结核分枝杆菌;(3)结核症状典型,接受诊断性抗结核治疗后全身症状缓解或胸水吸收、减少。恶性胸腔积液诊断标准:胸水脱落细胞学或病理提示可见肿瘤细胞。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患者入院次日 B 超定位后抽取胸水 5 ml,标本用无菌试管收集。离心上清液用于 ADA 检测,沉淀用于 TB-DNA 检测。

1.2.2 ADA 浓度测定 ADA 检测试剂盒为宁波瑞源生物科技有限公司生产,使用仪器为 BACKMAN COULTER-AU5800 全自动生化分析仪。以 ADA > 40 U/L 为阳性。操作按照说明书检测。

1.2.3 结核分枝杆菌 DNA 测定 结核分枝杆菌核酸检测试剂盒为上海复星长征医学科学有限公司生

产。应用荧光 PCR 技术进行 TB-DNA 检测,具体步骤如下:按照说明书检验方法检测。使用仪器为广州达安 DA7600 定量 PCR 仪。将 TB-DNA > 500 拷贝作为阳性标准。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,计数资料采用百分率表示,使用 χ^2 检验;计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。诊断一致性使用 Kappa 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADA、TB-DNA 及联合检测对结核性胸腔积液的诊断效能 ADA 检测结果的 Kappa = 0.782, TB-DNA 检测结果的 Kappa = 0.165, ADA + TB-DNA 检测结果的 Kappa = 0.822,提示 ADA + TB-DNA 联合诊断一致性最好,且与最终诊断符合程度较高。ADA + TB-DNA 联合诊断灵敏度为 91.3%,特异度为 91.1%,准确度为 91.2%。见表 1。

2.2 结核性胸腔积液与恶性胸腔积液患者年龄、性别及 ADA 水平比较 结核性胸腔积液与恶性胸腔积液患者性别比较无统计学差异($P > 0.05$);结核性胸腔积液患者 ADA 值显著高于恶性胸腔积液患者,年龄显著低于恶性胸腔积液患者(P 均 < 0.01)。见表 2。

3 讨论

在结核病的治疗中,快速检测临床标本中的结核分枝杆菌具有重要意义。因此,探索更快、更可靠并能增加灵敏度和特异度的常规辅助方法是有必要的。

先前,由于 ADA 具有简单易操作,性价比高的优点,已经被推荐为诊断结核性胸腔积液有较高价值的标志物。ADA 是嘌呤分解代谢中催化脱氨基反应的一种酶,可参与淋巴细胞的增殖和分化,特别是 T 淋巴细胞,当细胞内有活的病原体存在时,T 细胞被激活的过程中释放 ADA。结核性胸腔积液是结核杆菌抗原在胸膜腔内产生迟发型超敏反应的结果。这种免疫反应可刺激 T 淋巴细胞的分化,从而导致 ADA 的释放积聚增加。ADA 有很多亚型,其中最重要的是 ADA1、ADA2,ADA1 存在于所有细胞中,包括中性粒细胞,这也就解释了非结核患者的假阳性情况。然而 ADA2 只存在于单核细胞和巨噬细胞中,因此 ADA2 是存在于结核性胸腔积液中的主要亚型^[2],是 ADA 活性(85%)的主要组成部分。在临床实践中,同工酶的分析更加昂贵且不宜进行,因此,区分总 ADA 和 ADA2 的意义不大。本研究发现结核组中

表 1 ADA、TB-DNA 单一及联合检测对结核性胸腔积液的诊断效能

指标	灵敏度	特异度	准确度	阳性预测值	阴性预测值
ADA	87.0% (40/46)	91.1% (51/56)	89.2% (91/102)	88.9% (40/45)	89.5% (51/57)
TB-DNA	15.2% (7/46)	100.0% (56/56)	61.8% (63/102)	100.0% (7/7)	58.9% (56/95)
ADA + TB-DNA	91.3% (42/46)	91.1% (51/56)	91.2% (93/102)	85.7% (42/49)	92.7% (51/55)

表 2 结核性与恶性组相关检测指标比较

组别	例数	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	男/女(例)	ADA(U/L, $\bar{x} \pm s$)
结核组	46	39.9 ± 21.5	27/19	56.2 ± 19.5
恶性组	41	64.9 ± 13.9	22/19	8.5 ± 3.1
χ^2 值		6.507	0.224	16.360
P 值		0.000	0.636	0.000

ADA 浓度显著高于恶性组, ADA 检测敏感度 87.0%, 特异度 91.1%, 准确度 88.9%, 与文献报道一致^[3]。除外结核性胸腔积液, 还有其他可引起 ADA 升高的疾病: 感染性疾病中, 在细胞内有活的病原微生物存在时, ADA 可以升高, 如脓胸; 非感染性疾病者, 富含丰富淋巴细胞的胸腔积液中, ADA 也可升高, 如恶性疾病(如腺癌、白血病、淋巴瘤)、胶原蛋白血管疾病(如风湿性胸腔积液、系统性红斑狼疮)^[4]。在本研究中非结核胸腔积液中出现假阳性 5 例, 2 例为间皮瘤, 3 例为脓胸。结核胸腔积液还存在 6 例假阴性病例, 分析原因: (1) 老年人免疫功能下降, T 细胞成熟和活化障碍导致免疫细胞衰老, 机体免疫反应弱, 释放 ADA 减少。已有研究表明年龄与 ADA 值呈负相关性^[3]。多数情况下, ADA 临界值设于 35 ~ 40 U/L, 但很多研究表明胸腔积液的 ADA 值随年龄而减低, 因此, 建议降低年长者 ADA 的临界值以减少假阴性结果^[5-6]。(2) ADA 临界值的设定取决于结核病的流行程度^[7], 在高发区 ADA 临界值升高, 在结核低流行区, 应降低临界值以增加阴性预测值。(3) Sopori 等^[8]报道长期接触烟草的患者吸烟可以发生细胞形态学的改变和免疫功能的紊乱。在长期暴露于烟草的人群中, 尼古丁可抑制 T 细胞功能, T 细胞变得迟钝。本研究结果说明, 胸水 ADA 对诊断结核性胸腔积液具有较高的敏感度、特异度的优点, 但在临床中可能存在着一定的假阳性及假阴性可能。

如今, 许多分子技术可用于结核病的诊断, 具有快速、可靠的特点。TB-DNA 检测是利用 PCR 技术检测编码结核分枝杆菌的基因片段, 利用对基因组片段的扩增提取 DNA。PCR 技术已被证明是对结核分枝杆菌的临床样本一个有直接价值的特异性的检测工具, 在结核性胸腔积液诊断的应用中, 已使用的靶基因被广泛评价(如 IS6110、GCRS、MPB-64 和 devR), 不同的靶基因检测具有不同敏感性和特异性, 因此利用 PCR 技术诊断结核尚缺乏“金标准”。IS6110 是最

广泛使用的基因靶标, 仅次于通过 16S rRNA 基因或基因编码的 MPB-64 蛋白(38 kDa 和 65 kDa)。先前诸多研究发现, PCR 技术在结核性胸腔积液中检测的敏感度为 20% ~ 80%, 特异度 78% ~ 100%^[9-10]。本实验通过 PCR-Taqman 荧光探针法检测胸水中结核杆菌 IS6110 基因片段, 用于探测 IS6110 的引物序列是 5'-CCT GCG AGC GTA GGC GT-3' 和 5'-CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG-3'。本研究显示, TB-DNA 的敏感度为 15.2%, 特异度为 100%, 准确度为 61.8%, 与国外文献中胸水 TB-DNA 的敏感度较低报道一致, 因此, TB-DNA 阴性不能作为结核的排除诊断^[10]。在一些结核分枝杆菌菌株中 IS6110 为零或低拷贝数, 因而增加了假阴性几率。很多文献分析, 假阴性原因在于胸水中菌量较少^[11-12]; 结核菌在胸水中分布不均匀; 胸水中存在扩增的抑制剂; 结核菌株中缺乏 IS6110 基因靶点。最近研究报道, 针对胸膜活检组织检测, 可明显活检组织 TB-DNA 检测可增加 PCR 检测的阳性率^[13]。但胸膜活检是有创操作, 且诊断时长多于胸水 TB-DNA 检测, 不宜临床普及。本组研究无假阳性报道, 但有文献报道在结核的流行区, 结核分支杆菌能存在于很多不同类型的细胞中或定植在机体内, 而没有肺部受累的表现, 导致可能存在于标本中的炎症细胞或炎症细胞的 DNA 被隐藏, 造成假阳性结果, RT-PCR 检测结核分枝杆菌的 mRNA 可以帮助识别活菌, 从而提供更明确的诊断^[11]。本研究表明 TB-DNA 的检测(单独检测 IS6110)敏感度极低, 不适宜单独作为结核性胸腔积液的诊断, 易造成漏诊。

胸膜活检通常被认为是最重要的诊断胸膜疾病的方法, 特别是在区分肿瘤和结核方面, 阳性率在 50% ~ 85%^[14-15]。但操作有创伤性, 且需要专业人员操作, 不宜作为常规筛查。在结核好发地区, 当出现以淋巴细胞为主且伴高 ADA 水平的渗出液时, 可考虑诊断为结核性胸腔积液并可以通过抗结核治疗进一步证实^[15]。

通过对 ADA 及 TB-DNA 的联合检测显示敏感度为 91.3%, 特异度为 91.1%, 准确度为 91.2%。敏感度及准确度均高于 ADA 或 TB-DNA 的单项检测, 因此两种方法结合检测可增加诊断的敏感性和特异度。从而达到对结核性胸腔积液快速、准确诊断目的。

参考文献

- [1] Devkota KC, Shyam BK, Sherpa K, et al. Significance of adenosine deaminase in diagnosing tuberculous pleural effusion[J]. *Nepal Med Coll J*, 2012, 14(2):149.
- [2] Bielsa S, Palma R, Pardina M, et al. Comparison of polymorphonuclear-and lymphocyte-rich tuberculous pleural effusions[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2013, 17(1):85-89.
- [3] Abrao FC, de Abreu IR, Miyake DH, et al. Role of adenosine deaminase and the influence of age on the diagnosis of pleural tuberculosis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18(11):1363-1369.
- [4] 李惠民, 赵顺英. 结核性胸腔积液的诊断与治疗[J]. *中国实用儿科杂志*, 2017, 32(3):174-177.
- [5] Lee SJ, Kim HS, Lee SH, et al. Factors influencing pleural adenosine deaminase level in patients with tuberculouspleurisy[J]. *Am J Med Sci*, 2014, 348(5):362-365.
- [6] 邹兴武, 陈园园, 金春. 结核性胸膜炎胸腔积液腺苷脱氨酶活性与年龄的相关性研究[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2015, 7(12):124-126.
- [7] 任茗睿, 朱艳, 任少华, 等. 结核性胸腔积液实验室检测方法的研究进展[J]. *中国现代医生*, 2014, 52(27):157-160.
- [8] Sopori M. Effects of cigarette smoke on the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(5):372-377.
- [9] Reechaipichitkul W, Lulitanond V, Sungkeeree S, et al. Rapid diagnosis of tuberculous pleural effusion using polymerase chain reaction [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2000, 31(3):509-514.
- [10] Porcel JM. Advances in the diagnosis of tuberculouspleuritis [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(15):282.
- [11] Balne PK, Modi RR, Choudhury N, et al. Factors influencing polymerase chain reaction outcomes in patients with clinically suspected ocular tuberculosis [J]. *J Ophthalmic Inflamm Infect*, 2014, 4(1):10.
- [12] Trajman A, da Silva Santos Kleiz de Oliveira EF, Bastos ML, et al. Accuracy of polimerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis [J]. *Respir Med*, 2014, 108(6):918-923.
- [13] Du J, Huang Z, Luo Q, et al. Rapid diagnosis of pleural tuberculosis by Xpert MTB/RIF assay using pleural biopsy and pleural fluid specimens [J]. *J Res Med Sci*, 2015, 20(1):26-31.
- [14] Bibby AC, Maskell NA. Pleural biopsies in undiagnosed pleural effusions; Abrams vs image-guided vs thoracoscopic biopsies [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2016, 22(4):392-398.
- [15] Porcel JM, Azzopardi M, Koegelenberg CF, et al. The diagnosis of pleural effusions [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2015, 9(6):801-815.

收稿日期:2018-03-30 修回日期:2018-04-02 编辑:王宇

关于《中国临床研究》编辑部更改地址的通告

本编辑部于 2018 年 7 月下旬,已从南京市山西路 57 号原址搬迁至南京市山西路 8 号新址。请各相关单位、作者、读者采用新地址与本刊联系及办理信函、邮件等事宜,避免出错。由此带来的不便请见谅。

本刊邮政编码、网址、邮箱、电话等保持不变。

特此通告

本刊编辑部