

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.07.015

流式细胞术检测 CD161 对结核病的诊断效能*

陈 骑, 杨倩婷, 张明霞, 康 红[△]

深圳市第三人民医院肝病研究所, 广东深圳 518112

摘要:目的 探讨流式细胞术检测 CD161 对活动性肺结核的诊断效能, 并比较其与其他检测方法的差异。**方法** 采用流式细胞术检测 138 例体检健康者(健康对照组)和 178 例结核病患者(结核组)全血细胞中 CD161 的表达, 同时比较 CD161 检测技术、GeneXpert、结核分枝杆菌(TB)-DNA、痰涂片和 γ -干扰素释放试验(IGRAs)对结核病的检测阳性率, 以及在菌阴性肺结核患者和菌阳结核患者中的阳性率。**结果** CD161 诊断活动性肺结核患者的灵敏度为 72.47%, 特异度为 71.01%; CD161 检测技术、GeneXpert、TB-DNA、痰涂片和 IGRAs 方法在检测结核患者中的阳性率分别为 72.47%、50.34%、40.62%、33.33%、67.46%; 在菌阳性肺结核患者中, GeneXpert 检测阳性率最高, 为 97.96%, 在菌阴性肺结核患者中, CD161 检测技术阳性率最高, 为 72.64%。**结论** 流式细胞术检测 CD161 对活动性肺结核有很高的诊断价值, 可用于健康人群的体检筛查。

关键词: 结核病; 流式细胞术; CD161; GeneXpert; TB-DNA; 痰涂片; γ -干扰素释放试验
中图分类号: R446.6; R52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2021)07-0916-03

Efficacy of CD161 by flow cytometry in the diagnosis of active tuberculosis*

CHEN Qi, YANG Qianting, ZHANG Mingxia, KANG Hong[△]

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

Abstract: **Objective** To investigate the efficacy of CD161 by flow cytometry in the diagnosis of active tuberculosis, and to compare the difference between CD161 and other detection methods. **Methods** Flow cytometry was used to detect the expression of CD161 in peripheral blood of 138 healthy people (healthy control group) and 178 tuberculosis patients (tuberculosis group). The positive rates of CD161 test, GeneXpert, TB-DNA, sputum smear and γ -interferon release test (IGRAs) were compared for tuberculosis, as well as positive rates in negative and positive tuberculosis patients. **Results** The sensitivity and specificity of CD161 for active pulmonary tuberculosis were 72.47% and 71.01%, respectively. The positive rates of CD161, GeneXpert, TB-DNA, sputum smear and IGRAs were 72.47%, 50.34%, 40.62%, 33.33% and 67.46% respectively. The positive rate of GeneXpert (97.96%) was the highest in bacteria positive patients and CD161 (72.64%) was the highest in bacteria negative patients. **Conclusion** Flow cytometry detection of CD161 has a good diagnostic value for active tuberculosis, which could be used in physical examination of healthy people.

Key words: tuberculosis; flow cytometry; CD161; GeneXpert; TB-DNA; sputum smear; γ -interferon release test

结核病仍然是当前危害人类健康最严重的传染病之一。造成结核病流行的现状有多个方面的原因, 其中缺乏快速、有效的早期结核感染诊断技术是重要原因之一。因此, 结核分枝杆菌(TB)早期诊断对结核病防治具有重要意义。本文利用流式细胞仪检测全血细胞中 CD161 的表达, 并与现有结核病诊断的实验室方法进行对比, 评价其在临床应用的效能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院收治的活动性肺结核患者 178 例作为结核组。其中男 126 例, 女 52 例, 年龄

(52.32±1.34)岁。根据临床症状、胸部 X 线、抗酸杆菌痰涂片、痰结核菌培养及对抗结核治疗反应等诊断为活动性肺结核, 均接受抗结核治疗。另选取本院体检健康者 138 例作为健康对照组。男 97 例, 女 41 例, 年龄(52.61±1.27)岁, 均经胸部 X 线拍片或者 CT 检查, 排除肺部结核及肺外其他部位结核, 既往无结核病史, 无服用过抗结核药物。

1.2 仪器与试剂 7500 型 PCR 仪购自 ABI 公司, 全自动荧光定量 PCR 仪 Cepheid 工作站购自美国赛沛公司, 斑点 Elispot 读板仪购自美国 CTL 公司,

* 基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX10201301); 国家自然科学基金项目(81671984)。
作者简介: 陈骑, 男, 主管技师, 主要从事结核病免疫相关诊断标志物研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1094060162@qq.com。
本文引用格式: 陈骑, 杨倩婷, 张明霞, 等. 流式细胞术检测 CD161 对结核病的诊断效能[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(7): 916-918.

Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司。TB-DNA 核酸检测试剂盒(批号:20191001)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, IGRAs 试剂盒(批号:20190800905)购自北京同生时代生物科技有限公司, 流式细胞术 CD161 试剂盒(批号:20190901)购自深圳市联合医学科技有限公司; 全血用红细胞裂解液及抗 CD3(SY7)、抗 CD4(SY3)、抗 CD45(2D1) 购自美国 BD 公司, 抗 CD161(191B8)购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集两组研究对象肝素锂抗凝外周血, 采用于流式细胞仪检测 CD161。收集活动性肺结核组患者清晨痰液标本, 并进行痰涂片、TB-DNA 等检测。

1.3.2 全血细胞染色及流式细胞术分析 取 100 μ L 全血用红细胞裂解液裂解红细胞, 离心后收集细胞, 采用抗 CD3、抗 CD4、抗 CD45 和抗 CD161 等抗体进行表面染色, 室温避光孵育 15 min 后, 以磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍并进行流式细胞仪检测。分析单核细胞百分比、淋巴细胞百分比、淋巴细胞 CD161 百分比, 计算各标本的 RF 值。RF 值 = 淋巴细胞百分比 / 单核细胞百分比 $\times$ 淋巴细胞 CD161 百分比。

1.4 统计学处理 应用 GraphPad Prism V7 软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用非配对 t 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析灵敏度和特异度, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD161 对活动性肺结核的诊断效能 结核病组患者 RF 值(127.9 ± 8.6)低于健康对照组(224.2 ± 8.3), 差异有统计学意义($P < 0.001$)。为进一步明确 CD161 分辨结核患者和健康对照者的效能, 绘制 ROC 曲线, 结果显示其曲线下面积(AUC)为 0.80。当 RF 值 < 150 时, 灵敏度为 72.47%, 特异度为 71.01%。

2.2 CD161 检测方法与其他结核病实验室检测方法比较 现有的结核病常规检查方法主要包括 CD161 检测技术、痰涂片、GeneXpert、TB-DNA、 γ -干扰素释放试验(IGRAs), 其检测阳性率分别为 72.47%(129/178)、33.33%(53/159)、50.34%(74/147)、40.62%(52/128)、67.46%(85/126)。

2.3 不同方法学在菌阳、菌阴性肺结核患者中检测效率比较 根据痰涂片结果将结核患者分为菌阴性肺结核患者(77 例)和菌阳性肺结核患者(53 例), 进一步比较 GeneXpert、TB-DNA、IGRAs、CD161 检测方法的阳性率, 结果显示在菌阳性肺结核结合患者中, GeneXpert 检测阳性率最高, 在菌阴性肺结核患者中, CD161 检测技术阳性率最高。见表 1。

表 1 不同方法学检测在菌阳、菌阴性肺结核患者中的检测效率比较				
项目	<i>n</i>	检测例数(<i>n</i>)	阳性(<i>n</i>)	阳性率(%)
菌阳性肺结核患者 53				
GeneXpert		49	48	97.96
TB-DNA		43	36	83.72
IGRAs		43	36	83.72
CD161		53	39	73.58
菌阴性肺结核患者 77				
GeneXpert		93	26	27.96
TB-DNA		82	16	19.51
IGRAs		77	43	55.84
CD161		106	77	72.64

3 讨论

结核病在传染性疾病中病死率排名第一, 也是世界第九大死因疾病。自 2018 年以来, 结核病病死率进一步增加, 其中以人类免疫缺陷病毒(HIV)合并 TB 感染为主, 耐多药结核其次。结核病控制最有效的方法是早期诊断和干预, 但缺乏简单、经济、有效的诊断工具会妨碍结核病的准确检测。据报道, 近 1/3 HIV 感染者合并 TB 感染, 合并感染携带者更易发展为活动性肺结核^[1]。早期发现和诊断对防控结核病传播尤为关键。目前结核病的诊断实验室方法主要有 GeneXpert、痰涂片、TB-DNA 及 IGRAs 等, 但这些方法在诊断目前还不能完全满足临床的需要。GeneXpert 可快速诊断结核病并且可以检测利福平耐药性, 并且在菌阳性肺结核患者中的阳性率比较高, 在本研究中, 53 例菌阳性肺结核患者中 GeneXpert 检测的阳性率为 97.96%。然而, 该方法无法区分死细菌和活细菌中的 DNA^[2]。抗酸杆菌痰涂片方法无法区分 TB 与其他抗酸杆菌, 并且当每毫升痰液的细菌载量少于 10 000 个细菌时, 灵敏度大大降低^[3]; TB-DNA、IGRAs 方法则无法区分活动性肺结核患者和潜伏感染者^[4]。另外, 在本研究的 138 例健康人群中, 同时用 IGRAs 和 CD161 方法检测的效能相当, IGRAs 目前是健康人群是否结核病潜伏感染的常用方法, 但受其细胞免疫影响, 手工操作繁琐等, 使得检测结果时间较长。

CD161 是 C 型凝集素样受体, 可由多种细胞表达, 这些细胞包括 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞、 $\gamma\delta$ ⁺ T 细胞、自然杀伤(NK)细胞、与黏膜相关 T(MAIT)细胞^[5]。表达 CD161 分子的细胞在抗 EB 病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)以及流感病毒等微生物免疫方面有重要作用^[6]。但是其参与了类风湿关节炎、多发性硬化症、克罗恩病及原发性干燥综合征等自身免疫性疾病的病理过程^[7-10]。CD161 分子被认为是辅助性 T 细胞 17(Th17 细胞)的标志物^[11-12], Th17 细胞分泌的白细胞介素 17A(IL-17A)和 IL-17F 两种前炎症因子

在结核菌清除起到重要作用^[13]。因此,流式细胞术检测 CD161 方法在结核病的诊断中具有重要意义。本研究中,流式细胞术检测 CD161 方法可有效鉴别活动性肺结核患者与健康对照者,与已发表的研究一致^[5]。在判断结核病患者和健康对照者的灵敏度和特异度均为 72%左右。在菌阳、菌阴性肺结核患者中流式细胞术检测 CD161 方法检测阳性率明显高于 GeneXpert、TB-DNA 及 IGRAs 方法,且 CD161 方法更适用于对菌阴性肺结核患者的诊断。

另外,利用流式细胞术检测 CD161 的方法有其显著的优势:(1)该技术检测标本是外周血,与 GeneXpert、TB-DNA 等检测标本痰液相比,CD161 方法检测不受标本限制;(2)检测用血量少(1 mL),有利于在老年人或儿童等特殊场景的中应用;(3)检测方法简便、操作步骤容易掌握,有利于临床推广;(4)检测时间短,1 h 即可出结果。

综上所述,利用流式细胞术检测 CD161 对活动性肺结核有很高的诊断价值,可用于健康人群的体检筛查。

参考文献

[1] GLYNN J R, MURRAY J, BESTER A, et al. Effects of duration of HIV infection and secondary tuberculosis transmission on tuberculosis incidence in the South African gold mines[J]. AIDS, 2008, 22(14):1859-1867.

[2] 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.

[3] DESIKAN P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: is it still relevant[J]. Indian J Med Res, 2013, 137(3):442-444.

[4] JACOBS R, MALHERBE S, LOXTON A G, et al. Identification of novel host biomarkers in plasma as candidates for the immune diagnosis of tuberculosis disease and monitoring of tuberculosis treatment response[J]. Oncotar-

get, 2016, 7(36):57581-57592.

[5] YANG Q, 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.

[6] FERGUSSON J R, HÜHN M H, SWADLING L, et al. CD161(int)CD8⁺ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8⁺ T cells enriched within the gut[J]. Mucosal Immunol, 2016, 9(2):401-413.

[7] MIAO J, GENG J, ZHANG K, et al. Frequencies of circulating IL-17-producing CD4⁺CD161⁺ T cells and CD4⁺CD161⁺ T cells correlate with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. Mod Rheumatol, 2014, 24(2):265-270.

[8] ANNIBALI V, RISTORI G, ANGELINI D F, et al. CD161(high)CD8⁺ T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis[J]. Brain, 2011, 134(Pt 2):542-554.

[9] KLEINSCHEK M A, BONIFACE K, SADEKOVA S, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation[J]. J Exp Med, 2009, 206(3):525-534.

[10] ZHAO L, NOCTURNE G, HASKETT S, et al. Clinical relevance of RORγ positive and negative subsets of CD161⁺CD4⁺ T cells in primary Sjögren's syndrome[J]. Rheumatology (Oxford), 2017, 56(2):303-312.

[11] COSMI L, D E PALMA R, SANTARLASCI V, et al. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor[J]. J Exp Med, 2008, 205(8):1903-1916.

[12] 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.

[13] LYADOVA I V, PANTELEEV A V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers[J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015:854507.

(收稿日期:2020-09-11 修回日期:2021-01-17)

(上接第 915 页)

[7] 欧元红,覃锐祥,沈霜,等.不同麻醉方式输尿管镜钬激光碎石术的疗效比较[J].西部医学,2020,32(2):225-228.

[8] JAVANMARD B, FALLAH KARKAN M, RAZZAGHI M R, et al. Surgical management of vesical stones in children: a comparison between open cystolithotomy, percutaneous cystolithotomy and transurethral cystolithotripsy with holmium-YAG laser[J]. J Lasers Med Sci, 2018, 9(3):183-187.

[9] 庞晓磊.盐酸氢吗啡酮超前镇痛对全麻妇科腹腔镜手术患者的影响[J].实用中西医结合临床,2020,20(7):105-106.

[10] 刘超,辛忠.全身麻醉复合使用不同剂量右美托咪定对苏醒期患儿咽喉反射及苏醒质量的影响[J].医学研究杂志,2018,47(7):96-99.

[11] 冯甜甜.右美托咪啶在临床麻醉中的应用进展[J].中国城乡企业卫生,2020,35(7):78-80.

[12] 贾暄东,周脉涛,夏汝山.不同剂量雷米芬太尼复合丙泊酚在无痛肠镜检查中的应用[J].江苏医药,2019,45(9):883-885.

[13] 赖爱华,魏兵华.鼻咽通气道在静脉全麻下行肝癌微波消融术中的应用[J].临床医学工程,2012,19(5):752-753.

[14] BICK E, BAILES I, PATEL A, et al. Fewer sore throats and a better seal: why routine manometry for laryngeal mask airways must become the standard of care[J]. Anaesthesia, 2014, 69(12):1304-1308.

(收稿日期:2020-09-23 修回日期:2021-01-16)