

影响人体免疫系统,从而使免疫力下降并引起感染和肿瘤^[5]。所以通过纳入临床疑似感染的患者,通过对患者第一时间血常规、尿常规、尿培养、PLT 及 T 淋巴细胞亚群技术,通过敏感性分析发现 T 淋巴细胞亚群对于泌尿系感染的早期诊断效能明显高于 PLT 及尿 WBC 计数。此研究也说明了细菌感染会引起 T 淋巴细胞亚群数目减少,机体处于一个免疫抑制状态。此时如果通过及时应用敏感抗菌药物,以及提高免疫功能可以起到预防 SIRS 以及脓毒血症的发生。

综上所述,对于早期泌尿系感染,淋巴细胞亚群计数较 PLT 及尿 WBC 计数能够达到更好的诊断效果。

参考文献

[1] SIMON L, LACROIX J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection; a systematic review and meta-analysis [J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(2): 206-217.

[2] 张娜, 孙耕耘. 降钙素原在非感染性疾病中的临床意义 [J/CD]. 中华肺部疾病杂志电子版, 2016, 9(2): 198-200.

[3] MERCADO R, VIJH S, ALLEN S E, et al. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection[J]. J Immunol, 2000, 165(12): 6833-6839.

[4] HERRMANN T, LEES R K, MACDONALD H R, et al. In vivo responses of CD4⁺ and CD8⁺ cells to bacterial superantigens[J]. Eur J Immunol, 1992, 22(7): 1935-1938.

[5] ICHIHARA F, KONO K, TAKAHASHI A, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(12): 4404-4408.

(收稿日期: 2017-10-14 修回日期: 2017-12-25)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 08. 033

GeneXpert MTB/RIF 技术对肺结核的诊断效能评估

赵 平¹, 余 琴², 张 喻², 陈 亮¹

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院医学检验科/尿液细胞分子诊断北京市重点实验室 100038;

2. 北京市朝阳区疾病预防控制中心结核病门诊部 100029)

摘要:目的 评估 GeneXpert MTB/RIF 技术在快速诊断肺结核方面的应用价值。方法 收集 2015 年 1—6 月在北京市朝阳区结核病门诊就诊的 240 例疑似肺结核患者的痰液标本, 每份标本同时进行涂片萋-尼氏染色显微镜检查抗酸杆菌, 利用 BACTEC MGIT 960(M960)系统进行结核杆菌培养及药物敏感性试验和利用 GeneXpert MTB/RIF 系统进行结核分枝杆菌基因及利福平耐药性检测。结果 GeneXpert MTB/RIF, 试验阳性率为 36.3%(87/240), M960 系统培养阳性率为 33.8%(81/240), 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.33, P > 0.05$)。以培养阳性为标准, GeneXpert MTB/RIF 试验的灵敏度为 84.0%(68/81), 特异度为 87.8(129/147), 阳性预测值为 78.2%(68/87), 阴性预测值为 87.2%(129/148)。GeneXpert MTB/RIF 系统和 M960 系统检测结果一致性为 82.8%, Kappa 值为 0.73。结论 GeneXpert MTB/RIF 系统技术操作简便, 阳性检出率和灵敏度均较高, 对快速诊断肺结核具有较高的临床应用价值。

关键词: 结核分枝杆菌; GeneXpert MTB/RIF; 利福平; 分子诊断技术

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)08-1159-04

目前, 结核病仍然是世界范围内致死率较高的传染病。2015 年, 全世界大约有 1 040 万人新发结核病, 140 万人死于结核病^[1]。我国是全球结核病高负担国家之一, 结核病患者数居世界第二位, 并且占全球病例数的 11%, 2015 年的发病人数估计在 91.8 万人^[1-2]。缺乏准确、快速的结核分枝杆菌检测方法是结核病治疗管理方面的主要障碍。目前我国结核病防治所和一些综合医院主要依靠痰涂片检查抗酸菌和罗氏固体培养并结合患者临床症状和 X 线表现来诊断肺结核。结核分枝杆菌培养被认为是最终诊断的“金标准”, 但是培养耗时较长, 一般 2~8 周出结果。尽管痰涂片萋-尼氏染色显微镜检查抗酸菌是一

种快速并且廉价的检测方法, 但是其敏感性较差^[3]。因此, 依赖于核酸扩增技术的结核分枝杆菌快速检测对患者的早期治疗, 改善患者预后以及进行有效的公共卫生干预都非常重要^[4]。近几年, 多种分子生物学方法已经被用于结核病的诊断和结核分枝杆菌耐药的快速检测, 包括线性探针试验、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)和 GeneXpert MTB/RIF 技术等。但是, 在我国分子生物学技术检测痰标本中结核分枝杆菌还不是一线检测方法, 其检测效能还需进一步确定。本研究对 GeneXpert MTB/RIF 技术在诊断肺结核方面的能力进行评估, 探讨其在基层实验室的应用前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1—6 月来北京市朝阳区结核病门诊就诊的疑似肺结核患者治疗前的痰标本 240 份,每份标本 3~5 mL,其中 112 份来自女性患者,128 份来自男性患者,患者年龄 16~78 岁,中位年龄为 36.5 岁,疑似肺结核患者的诊断按照《肺结核诊断标准(WS288-2008)》执行。

1.2 仪器与试剂 光学显微镜(Olympus, CX31RBSF)、萼-尼(Ziehl-Neelsen, Z-N)染色液(珠海贝索生物技术有限公司, BASO)、BACTEC MGIT 960 结核分枝杆菌快速培养系统(M960, Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA)、GeneXpert 检测系统和检测试剂盒(Cepheid, Inc, Sunnyvale, CA, USA)。

1.3 方法

1.3.1 涂片、染色及镜检 每份痰标本先进行涂片,并对涂片进行萼-尼染色,光学显微镜下检查抗酸杆菌。涂片、染色及镜检方法按《现代结核病诊断技术》^[5]方法操作。

1.3.2 培养及药敏试验 涂片后的每份痰标本被分为两份,一份用 L-半胱氨酸氢氧化钠法进行去污染处理^[6]。处理后的标本接种在 M960 液体培养基中,放在 M960 系统内进行培养,培养方法参照仪器说明书进行。培养阳性的菌株用 M960 系统进行异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇的敏感性试验,方法参照试剂盒说明书。于此同时,阳性菌株接种在对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基上进行初步的菌种鉴定。

1.3.3 GeneXpert MTB/RIF 试验 另一份标本按照文献^[7-8]及产品说明书进行 GeneXpert MTB/RIF 试验。即用 2.0 mL 的 GeneXpert MTB/RIF 样本处理液加入到含 1 mL 痰标本的无菌离心管中,室温静置 15 min,期间手动震荡离心管 2 次,取处理后的标本 2.0 mL 加入到测试盒中,将测试盒放入到仪器内进行检测。

1.3.4 质量控制 在每批次痰标本进行涂片染色镜检时,以卡介苗菌液涂片为阳性质控,以大肠埃希菌菌液涂片为阴性质控,阴性和阳性质控片各 1 张。每批次结核分枝杆菌培养和药敏试验均使用标准敏感菌株 H37Rv 进行质控检测。GeneXpert MTB/RIF 法每个测试进行样品处理质量控制(SPC)和探针检查质量控制(PCC),同时对 H37Rv 菌株进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计分析,应用 χ^2 检验对涂片、培养和 GeneXpert MTB/RIF 系统的检验效能进行比较分析,一致性检验采用 Kappa 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质控结果 每批次卡介苗菌液涂片抗酸染色均阳性,大肠杆菌菌液涂片抗酸杆菌染色均阴性;H37Rv 质控菌株培养均阳性,异烟肼、利福平、乙胺丁醇和链霉素的药敏试验均敏感;GeneXpert MTB/RIF 试验在检测标本时有 1 份标本出现质控无效,造成检测结果失败,每批次检测 H37Rv 时 DNA 检测均阳性,利福平药敏试验结果均为敏感。

2.2 3 种方法阳性检出情况 痰涂片镜检阳性率为 18.8% (45/240), M960 培养阳性率为 33.8% (81/240), GeneXpert MTB/RIF 阳性率为 36.3% (87/240)。GeneXpert MTB/RIF 和 M960 培养与痰涂片镜检阳性率之间的差异均有统计学意义($\chi^2 = 18.49$, 13.99 , $P < 0.05$), GeneXpert MTB/RIF 与 M960 培养阳性率之间的差异无统计学意义($\chi^2 = 0.33$, $P > 0.05$)。以 M960 培养为金标准, GeneXpert MTB/RIF 的灵敏度为 84.0% (68/81, 95% CI: 76.0~91.9), 特异度为 87.8 (129/147, 95% CI: 82.5~93.1), 阳性预测值(PPV)为 78.2% (68/87, 95% CI: 69.5~86.8), 阴性预测值(NPV)为 87.2% (129/148, 95% CI: 81.8~92.6); 涂片镜检的灵敏度为 51.9% (42/81, 95% CI: 41.0~62.7), 特异度为 98.6 (145/147, 95% CI: 96.8~100.0), PPV 为 93.3% (42/45, 95% CI: 86.0~100.0), NPV 为 75.1% (145/193, 95% CI: 69.0~81.2)。GeneXpert MTB/RIF 和涂片镜检在灵敏度、特异度、PPV 和 NPV 之间差异均有统计学意义($\chi^2 = 19.15$, 13.73 , 4.92 , 7.68 , $P < 0.05$)。

2.3 3 种方法阳性检出时间比较 GeneXpert MTB/RIF 系统阳性结果报告时间(从标本处理到阳性结果报出)为 2.5 h;痰涂片显微镜检查报阳时间平均为 3.5 h(包括涂片、干燥、染色及镜检时间);M960 培养系统阳性报告时间平均为 12 d,培养 42 d 无结核分枝杆菌生长报告培养阴性。

2.4 药敏试验结果比较 GeneXpert MTB/RIF 检出 7 例利福平耐药,耐药率 2.9% (7/240), M960 系统比例法药敏试验检出 4 例利福平耐药,6 例异烟肼耐药,8 例链霉素耐药,8 例乙胺丁醇耐药,利福平耐药率 1.7% (4/240),两者比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.84$, $P > 0.05$)。GeneXpert MTB/RIF 检测出 7 例利福平耐药,其中 4 例 M960 系统药敏试验显示为利福平耐药,并且是耐多药,2 例 M960 系统培养阴性,1 例 M960 系统药敏试验显示为利福平敏感。

2.5 GeneXpert MTB/RIF 和 M960 系统一致性分析 两种方法检测结核分枝杆菌的一致性为 82.8%, Kappa 值为 0.73 (95% CI: 0.61~0.86)。

2.6 GeneXpert MTB/RIF 和 M960 系统不一致分析 所有标本中有 19 份标本 GeneXpert MTB/RIF 系统检测阳性,但 M960 系统培养阴性,通过查阅患者病历,这 19 例患者中有 15 例被医生诊断为肺结核,并进行了相应的治疗,治疗后病情好转。有 4 例被诊断为肺结核陈旧灶或稳定灶,未进行抗结核治疗。

3 讨论

GeneXpert MTB/RIF 系统是一种自动、快速的分子诊断设备,集标本处理和半巢式 PCR 于一体的结核分枝杆菌鉴定和利福平耐药检测设备,其操作简单、方便^[8]。在 HIV 高流行或结核病高耐药地区此技术已经作为疑似肺结核的一线检测方法。

GeneXpert MTB/RIF 试验以半巢式 PCR 为基础,此技术将 PCR 的样品准备、DNA 扩增和 DNA 检测 3 个步骤整合在一起。样品处理后加入到测试盒中,在微流样品盒里完成 DNA 提取的所有复杂步骤,并可将提取的 DNA 进行浓缩和纯化,以增加测试的灵敏度。浓缩纯化后的标本 DNA 进入微反应管中,并在其中扩增至被检测到。DNA 提取、检测的整个过程均在仪器配套的密闭的测试盒内完成,完全实现自动化,避免人为因素的污染。其对 DNA 序列的检测具有高度光学敏感性,实时的荧光监测使得软件一经发现目标序列即可及时给出结果,极大缩短了检测时间,检测全过程仅 2 h。

本研究对 GeneXpert MTB/RIF 在临床痰标本中检测结核分枝杆菌的检测效能进行了初步评估。以前的研究显示,以 M960 培养为标准,GeneXpert MTB/RIF 系统检测结核分枝杆菌的灵敏度为 86.2%~97.1%,特异度为 95.3%~99.4%^[9-11]。在本研究中,GeneXpert MTB/RIF 系统检测结核分枝杆菌的阳性率为 36.6%,明显高于涂片检查(18.49%),差异有统计学意义($P < 0.05$),略高于 M960 液体培养系统阳性率(34.0%),差异无统计学意义($P > 0.05$)。其灵敏度和特异度分别为 84.0%和 87.8%,与以往的研究结果相似。

涂片镜检的阳性率明显低于 GeneXpert MTB/RIF 方法和培养,主要是因为其方法的局限性,每毫升标本中需要 1 104~5 103 个菌才能检出^[12],GeneXpert MTB/RIF 方法每毫升痰标本需要 131 个标本就能检出^[7],而将痰标本离心浓缩后培养其阳性检出限可达到 10~100 CFU/mL^[12]。

本研究中,与 M960 培养系统比较,GeneXpert MTB/RIF 系统显示了较好的阳性检出率,与 M960 系统具有较好的一致性,并且阳性检出时间明显短于培养方法,这对早期发现患者,快速诊断、及时治疗患

者非常重要。

本研究中有 19 份标本 GeneXpert MTB/RIF 检测阳性,但 M960 培养阴性,13 份标本 GeneXpert MTB/RIF 检测阴性,但 M960 培养阳性。这可能主要是因为标本中的菌量在检测方法检出限水平附近时,在检测过程中受到外界的影响较大,如标本采集、标本的处理等都可能影响到检测结果的准确性。另外,GeneXpert 方法是检测结核分枝杆菌 DNA,包括活菌和死菌的 DNA。而 M960 培养只能检测到活菌,因此,在标本处理过程中被杀灭掉的结核分枝杆菌不能被 M960 系统检测到,而 GeneXpert 系统可能检测出。一些标本被 M960 系统检测出结核分枝杆菌,而 GeneXpert 系统未检测出,可能是由于标本中菌量未达到 GeneXpert 系统的检出限。

结核分枝杆菌中的 rpo B 基因是利福平耐药基因,95%以上对利福平耐药的结核分枝杆菌有 rpo B 基因的变异。GeneXpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平的耐药性是以 rpo B 基因为靶基因。仪器自动提取结核分枝杆菌 DNA 后,对 rpo B 基因的 192 bp 片段进行检测,并采用 6 种分子信标同时检测 6 种探针,其中 5 个相互重叠分子探针(分别以探针 A-E 命名)选择性覆盖 rpo 基因的 81 bp 核心区,检测结核分枝杆菌存在的同时可以探知利福平是否耐药。本研究显示,7 例对利福平耐药,其中 4 例 M960 显示利福平耐药,2 例 M960 培养阴性,1 例显示敏感。有文献报道,以常规药敏试验为检测利福平耐药的 gold 标准,GeneXpert MTB/RIF 技术对利福平耐药的灵敏度和特异度分别为 94.1%和 97.0%^[13-14]。另外,有大约 86%的利福平耐药菌株同时对异烟肼耐药,因此,在利福平耐药的情况下,一定程度下可作为耐多药结核分枝杆菌的监测指标^[15]。由于本研究中耐利福平病例数较少,因此其药敏结果与 M960 药敏结果的比较还需进一步研究。

综上所述,GeneXpert MTB/RIF 系统技术操作简便,阳性检出率和敏感性均较高,并且不需较高的专业技能,普通技术人员经过基本的培训即可操作。因此,该方法在我国基层实验室对结核病诊断及利福平耐药患者的筛查有一定的应用前景。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2016[R]. Geneva:WHO,2016.
- [2] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2012[R]. Geneva:WHO,2012.
- [3] 宋媛媛,郑惠文,赵雁林.我国结核病实验室诊断进展历程[J].中国防痨杂志,2014,36(9):764-768.
- [4] ZHAO P, YU Q, CHEN L, et al. Evaluation of a liquid

culture system in the detection of mycobacteria at an anti-tuberculosis institution in China: a retrospective study[J]. J Int Med Res, 2016, 44(5): 1055-1060.

[5] 张贺秋, 赵雁林. 现代结核病诊断技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 50-56.

[6] QUISPE R, VALLE G A, HUAPAYA J A, et al. Manual MGIT™ system for the detection of Mycobacterium tuberculosis: insights from a high TB burden setting[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(5): 605-610.

[7] HABTE D, MELESE M, HIRUY N, et al. The additional yield of GeneXpert MTB/RIF test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis among household contacts of smear positive TB cases[J]. Int J Infect Dis, 2016(49): 179-184.

[8] HELB D, JONES M, STORY E, et al. 2010. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(13): 29-37.

[9] BOEHME C C, NICOL M P, NABETA P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study[J]. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.

[10] MARLOWE E M, NOVAK-WEEKLEY S M, CUMPIO J, et al. Evaluation of the cepheid xpert MTB/RIF assay for direct detection of mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6): 1621-1623.

[11] BUNSOW E, RUIZ-SERRANO M J, LÓZ R P, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampin in clinical specimens[J]. J Infect, 2014, 68(12): 338-343.

[12] PIATEK A S, VAN CLEEFF M, ALEXANDER H, et al. GeneXpert for TB diagnosis: planned and purposeful implementation[J]. Glob Health Sci Pract, 2013, 1(1): 18-23.

[13] BOEHME C C, NABETA P, HILLEMANN D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.

[14] CHANG K, LU W, WANG J, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis [J]. J Infect, 2012, 64(6): 580-588.

[15] MOKROUSOV L, OTTEN T, VYSHEVSKIY B, et al. Allele-specific rpo B PCR assays for detection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in sputum smears[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(7): 2231-2235.

(收稿日期: 2017-07-24 修回日期: 2017-10-09)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 08. 034

联用 IGF-1、CEA、CA19-9 指标进行直肠癌患者 临床病理分期预判的效果分析

宋 哲, 贾 楠, 陈宝胜, 周文勇
(河北省沧州市中心医院普外二科 061001)

摘要:目的 分析联用 IGF-1、CEA、CA19-9 指标进行直肠癌患者临床病理分期预判的效果。方法 选取该院 2015 年 2 月至 2017 年 2 月收治的 139 例直肠癌患者的临床资料, 根据 Dukes 分期分为 I ~ II 期 71 例、III 期 48 例、IV 期 20 例。回顾性分析直肠癌患者 IGF-1、CEA、CA19-9 指标与患者临床病理分析的关系和联用 IGF-1、CEA、CA19-9 的临床意义。结果 不同临床分期直肠癌患者的 IGF-1、CEA、CA19-9 水平差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 3 个指标串联诊断直肠癌的临床分期, I ~ II 期患者诊断的正确率为 80.28%, III 期正确率为 87.50%, IV 期正确率为 95.00%, 且 IGF-1、CEA、CA19-9 3 个指标串联用于直肠癌的诊断筛查, 3 个分期的灵敏度、特异度和约登指数均较高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 临床上联用 IGF-1、CEA、CA19-9 指标进行直肠癌患者临床病理分期预判的效果显著, 值得临床推广。

关键词: 直肠癌; 临床病理; 分期预判
中图法分类号: R735.3+7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2018)08-1162-03

直肠癌是临床上比较常见的恶性消化道肿瘤之一, 严重威胁人类的健康^[1]。近年来, 直肠癌的发病率和病死率呈逐年上升趋势, 发病年龄明显提前。对其进行早期诊断以及准确估计预后, 对提高结直肠癌患者的治愈率和生存率具有重要的临床意义^[2-3]。联合多种指标检测是提高直肠癌诊断准确率的一种方法。为进一步探讨联用 IGF-1、CEA、CA19-9 进行直肠癌患者临床病理分期预判的效果, 本研究对本院收治的 139 例直肠癌患者进行了分期对照研究, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 2 月至 2017 年 2