

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.01.022

◇临床医学◇

利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术 联合 T 细胞斑点试验对泌尿系结核的诊断效果评价

吴素方, 梁丽丽, 郑淑兰, 刘新

作者单位: 河南省胸科医院结核科, 河南 郑州 450003

基金项目: 河南省科技攻关项目(152102310152)

摘要: **目的** 探讨利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(GeneXpert MTB/RIF)联合结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT)对泌尿系结核(urinary tuberculosis, UTB)的诊断效能。**方法** 选择 2017 年 1 月至 2018 年 12 月河南省胸科医院就诊临床疑似 UTB 的病人。分别采集样本进行抗酸涂片、液体培养、GeneXpert MTB/RIF 和 T-SPOT 检测。使用 χ^2 检验对不同检测方法的灵敏度进行比较。**结果** 其中 42 例(47.1%)病人临床确诊为泌尿系结核。在泌尿系结核病例中, 单项检测的阳性率最高的为 T-SPOT, 达到 85.7%(36/42), 但在非泌尿系结核病例中的阳性率也最高, 达到 25.5%(12/47)。GeneXpert MTB/RIF 和 T-SPOT 联合检测的特异度为 100%; 其联合检测灵敏度为 89.4%, 显著高于其他四项单独检测, 分别为: 抗酸涂片 11.8% ($\chi^2 = 57.225, P < 0.001$)、液体培养法 42.8% ($\chi^2 = 19.112, P < 0.001$)、GeneXpert MTB/RIF 检测 64.2% ($\chi^2 = 7.823, P < 0.01$) 和 T-SPOT 检测 85.7% ($\chi^2 = 2.573, P < 0.05$)。**结论** GeneXpert MTB/RIF 和 T-SPOT 联合检测对于泌尿系结核的临床诊断有很好的临床应用价值, 值得推广应用。

关键词: 结核, 泌尿生殖系统; 结核菌素试验; 核酸扩增技术; 聚合酶链反应; 利福平

Evaluation on urinary tuberculosis diagnostic efficacy of GeneXpert MTB/RIF combined with T-SPOT

WU Sufang, LIANG Lili, ZHENG Shulan, LIU Xin

Author Affiliation: Department of Tuberculosis Infection, Henan Provincial Chest Hospital,
Zhengzhou, Henan 450003, China

Abstract: Objective To investigate the diagnostic efficacy of GeneXpert MTB/RIF combined with T-SPOT for urinary tuberculosis. **Methods** Patients with clinically suspected urinary tuberculosis from January 2017 to December 2018 in Henan Provincial Chest Hospital were selected. Samples were collected for acid-fast smear, liquid culture, GeneXpert MTB/RIF and T-SPOT tests. The chi-square test was used to compare the sensitivity of different detection methods. **Results** A total of 89 cases met the inclusion criteria. Among them, 42 cases (47.1%) were diagnosed clinically as urinary tuberculosis. Among these cases, the highest positive rate was T-SPOT, which reached 85.7% (36/42), but its positive rate in non-urinary TB cases was also the highest 25.5% (12/47). The specificity of GeneXpert MTB/RIF and T-SPOT combined detection was 100%. The sensitivity was 89.4%, which was significantly higher than that of the other four separate tests: 11.8% for acid-fast smear ($\chi = 57.225, P < 0.001$), 42.8% for liquid culture method ($\chi = 19.112, P < 0.001$), 64.2% for GeneXpert MTB/RIF test ($\chi = 7.823, P < 0.01$) and 85.7% for the T-SPOT test ($\chi = 2.573, P < 0.05$). **Conclusion** The combination of GeneXpert MTB/RIF and T-SPOT detection has a good value for the clinical diagnosis of urinary tuberculosis, which is worthy of widespread application.

Key words: Tuberculosis, urogenital; Tuberculin test; Nucleic acid amplification techniques; Polymerase chain reaction; Rifampin

泌尿系结核(urinary tuberculosis, UTB)是一种较严重的肺外结核类型, 其发病率约占结核病的 4%, 在肺外结核病人中其发病率 30%~40%^[1]。UTB 起病隐匿, 临床表现具有多样性, 可表现为腰部疼痛、午后低热、尿急、尿频、尿痛、乏力、排尿不适等, 其临床症状通常在疾病晚期出现, 常导致诊断的延误, 进而引起泌尿系统器官的损毁^[2], UTB

的临床表现特点, 突显了早期快速诊断的重要性。目前, 结核病诊断的“金标准”是细菌学检查, 但是由于 UTB 病人的尿液标本分枝杆菌培养需时长, 且阳性率低, 不能满足临床早期快速诊治的需要; 传统涂片镜检抗酸涂片假阳性率较高, 结果往往不可靠。因此, 迫切需要能够快速准确检测结核分枝杆菌复合群的新方法。利福平耐药实时荧光定量核

酸扩增检测技术(GeneXpert MTB/RIF, 简称 Xpert)是一种全新的分子诊断技术,具有较高的诊断灵敏度^[3-4];结核感染T细胞斑点试验(T-SPOT)具有快速简便、特异性高的特点^[5-7]。近年来,使用两种方法用于肺结核诊断的文献报道很多,但少有联合用于肺外结核诊断的比较研究。本文主要探讨 Xpert 联合 T-SPOT 对 UTB 诊断效能的评价,旨在为 UTB 早期诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2017年1月至2018年12月河南省胸科医院就诊,临床疑似UTB病人89例。病人入组条件为具有尿急、尿频、尿痛、排尿不适、血尿、腰痛、乏力等临床症状或尿常规检查异常病人。所有接受抗结核药物治疗不足1个月,未进行泌尿系手术治疗。所有病人HIV检测阴性。

病人的人口学信息及临床特征(如性别、年龄、病史、并发症、泌尿系统器官累及的范围及病变形式)等内容均来源于临床原始病史记录,临床资料完整。病人或其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 UTB 病人的临床诊断依据和排除标准 BACTEC MGIT 960 分枝杆菌培养阳性;典型的临床表现、实验室尿常规检测、结核菌素试验、结核感染T细胞斑点试验(T-SPOT)等相关检查有阳性结果、泌尿系影像学表现、膀胱镜活检病理检查有结核、抗结核药物治疗反应良好。临床诊断为非UTB的依据为:病人没有结核分枝杆菌培养、影像学、病理学等其他结核方面证据,并且抗结核药物治疗无效者。

1.3 检测方法

1.3.1 样本采集 收集每例病例24 h尿沉渣标本至少5 mL,每份标本进行涂片查抗酸杆菌、MGIT 960分枝杆菌培养和Xpert检测。同时取病人静脉血5 mL,肝素抗凝,进行T-SPOT检测。

1.3.2 尿液标本涂片查抗酸杆菌 一次性吸管吸取少许无菌标本采集管中的尿液标本涂于载玻片上进行荧光染色(珠海贝索生物有限公司),置光学显微镜下(Olympus,日本)观察计数,以每50个视野抗酸杆菌 ≥ 3 条为阳性。

1.3.3 液体培养 取2 mL尿液标本用于培养,使用MGIT 960分枝杆菌液体培养系统(BD,美国)按照操作说明书进行。液体培养时间设定为42 d。仪器自动报告阳性后,取培养液涂片镜检,若查到抗酸杆菌则为阳性;若未见抗酸杆菌则为阴性。

1.3.4 Xpert 检测 取1 mL尿液标本与标配处理液

常规按1:2比例混合,旋紧管盖,涡旋振荡15-30 S,室温静置15 min,使标本充分液化。吸取2 mL液化的标本至Xpert反应试剂盒,置于Xpert检测系统(Cepheid,美国),仪器开始进行自动化检测。约2 h反应结束后,在检测系统窗口下可直接观察测试结果判读检测结果,结果根据探针循环阈值(Ct值)判断^[5]。当内对照探针Ct值 ≤ 38 视为阳性,对照探针Ct值 > 38 视为阴性;如果读出结果显示“invalid”“error”“no result”时,若样本足够时应重复检测一次。

1.3.5 T-SPOT 试验 采集病人空腹静脉血5 mL,肝素抗凝,加入淋巴细胞分离液离心,分离外周血单个核细胞,洗涤与计数后制备成工作浓度细胞悬液,将工作悬液和结核特异抗原加入预包被有干扰素- γ (IFN- γ)抗体反应孔中,37℃、5%二氧化碳孵育过夜,洗涤微孔板加入酶标抗体,洗涤微孔板加入底物反应液,记录斑点形成细胞数。结果判读:当阴性对照孔斑点数0-5,ESAT-6或CEP-10抗原孔斑点数-阴性对照孔斑点数 ≥ 6 时,则为阳性;当阴性对照孔斑点数 ≥ 6 时,孔斑点数 ≥ 2 倍阴性对照斑点数时,则为阴性。

1.3.6 灵敏度和特异度的计算 以临床诊断为标准。灵敏度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 一般情况和检测结果 共计91例病例符合纳入条件,其中2例为HIV感染者,最终进行数据分析的病例数为89例。其中42例(47.1%)病例临床确诊为UTB,UTB病人中分枝杆菌培养阳性18例(42.8%);其余24例(57.1%)以典型临床表现、泌尿系相关影像学表现、膀胱镜活检病理结果、及抗结核药物治疗有效等作为诊断依据。47例(52.8%)病例被临床诊断为非泌尿系结核。见表1。

表1 临床疑似UTB病人89例临床检测结果的比较/例(%)

检测项目	总阳性 (n=89)	UTB (n=42)	非UTB (n=47)
抗酸涂片	7(7.9)	5(11.9)	2(4.3)
液体培养	18(20.2)	18(42.8)	0(0.0)
Xpert	27(30.3)	27(64.3)	0(0.0)
T-SPOT	26(29.2)	36(85.7)	12(25.5)
Xpert+TSPOT	38(42.7)	38(90.5)	0(0.0)

注:UTB为泌尿系结核,Xpert为利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术,T-SPOT为结核感染T细胞斑点试验

UTB病例的临床资料显示,其病程较长,一般1.5~3年,在各个年龄段均有发病,但以老年男性居

多。病人通常合并有尿常规的异常比例升高,临床表现更多地表现为尿频、尿急、夜尿增多等储尿期症状及腰痛明显;同时伴有严重的肾脏破坏,更易并发肾盂积液,输尿管增厚、狭窄或扩张,膀胱挛缩等症状。与非 UTB 病人相比,病人同时合并有生殖系统结核及慢性肾脏疾病的比例升高。

2.2 Xpert 联合 T-SPOT 诊断 UTB 的灵敏度和特异度 以临床诊断作为金标准,抗酸杆菌涂片、液体培养、Xpert 和 TSPOT 以及 Xpert+TSPOT 联合检测的灵敏度和特异度,见表 2。

表 2 临床疑似 UTB 病人 89 例 5 种检测方法的灵敏度和特异度比较/例(%)

检测方法	例数	灵敏度	特异度
抗酸涂片	5	5(11.8)	45(95.7)
液体培养	18	18(42.8)	47(100.0)
T-SPOT	36	36(85.7)	35(74.4)
Xpert	27	27(64.2)	47(100.0)
Xpert+TSPOT	38	38(89.4)	47(100.0)

注:UTB 为泌尿系结核,Xpert 为利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术,T-SPOT 为结核感染 T 细胞斑点试验

抗酸杆菌涂片的灵敏度为 11.8%,显著低于液体培养的灵敏度 42.8% ($\chi^2 = 21.215, P < 0.001$)。T-SPOT 的特异性为 74.4%,显著低于抗酸杆菌涂片的特异度 95.7% ($\chi^2 = 11.255, P < 0.01$)。T-SPOT 的灵敏度为 85.7%,显著高于 Xpert 的灵敏度 ($\chi^2 = 15.321, P < 0.01$)。

Xpert+T-SPOT 联合检测的特异度为 100%,灵敏度为 89.4%,显著高于抗酸涂片 ($\chi^2 = 57.225, P < 0.001$)、液体培养法 ($\chi^2 = 19.112, P < 0.001$)、Xpert 检测 ($\chi^2 = 7.823, P < 0.01$) 和 T-SPOT 检测 ($\chi^2 = 2.573, P < 0.05$)。

3 讨论

UTB 起病隐匿,泌尿系统的损伤呈渐进性发展,早期临床表现的缺乏和非特异性常导致诊断的延误。这对临床上 UTB 的诊断提出了挑战。Xpert 是世界卫生组织(WHO)推荐的遏制结核病的检测方法^[8-9],于 2013 年又推荐用于肺外结核的诊断^[10]。近年来的多项研究表明,Xpert 用于肺结核的诊断均有较高的灵敏度和特异性,但对肺外结核的诊断研究并不多。Bahr 等^[11]证实了应用 Xpert 检测脑脊液标本诊断结核性脑膜炎的灵敏度达 72.0% (13/18),远高于脑脊液抗酸杆菌涂片灵敏度(27.8%, 5/18; $P = 0.008$),与结核分枝杆菌培养灵敏度相似 71.2% (12/17),但培养法造成了 27d 的诊断延误。王桂荣和黄海荣^[12]应用 Xpert 技术通过检测骨关节结核部位的

脓液标本证实了此项技术快速诊断骨关节结核的高灵敏度(82.0%, 41/50)和高特异度(100.0%, 10/10),并证实了 Xpert 检测利福平耐药的灵敏度和特异度均为 100.0%。本研究中,Xpert 检测的灵敏度为 64.2%,低于以上研究结果,考虑可能与尿液结核菌含量较低、Xpert 检测方法检测限值有关。

T-SPOT 通过结核分枝杆菌特异性抗原多肽刺激 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ ,与微孔板 IFN- γ 抗体结合,通过显色反应后形成色素沉淀斑点,达到诊断结核感染的目的^[13-14],是一项检测血清干扰素- γ (IFN- γ)、抗原特异 T 淋巴细胞极为敏感的技术,且不会受到 T 淋巴细胞数量、卡介苗和非结核杆菌的影响,即使在免疫功能低下的人群中,T-SPOT 的灵敏度仍然较高^[15-17]。本研究中血清 T-SPOT 检测的灵敏度为 85.7% (36/42),特异度为 74.4% (35/47),且在临床诊断为 UTB,而在涂片、培养及 Xpert 均为阴性的病人中 T-SPOT 的阳性率为 81.3% (26/32)弥补了 UTB 病原学检测灵敏度低的问题。本研究结果显示 T-SPOT 在非 UTB 病人中的阳性率达到 25.5%,显著高于其他方法,究其原因可能是由于其对潜伏性结核感染的灵敏度较高,我国是结核高负担国家,人群中潜伏性结核感染率较高,这就是导致 T-SPOT 检测特异度不高的原因。

在临床诊断 UTB 病人中,Xpert 联合 T-SPOT 检测的灵敏度为 89.4% (38/42),特异度为 100% (47/47),其灵敏度及特异度显著大于抗酸涂片,液体培养,Xpert 检测以及 T-SPOT 检测,两者的联合使用既弥补了 Xpert 的灵敏度不足也能够弥补 T-SPOT 特异度不足的缺陷,且用时更短。UTB 的早期临床表现的隐匿性和不典型性,使其诊断较为困难,因此,尽早对可疑病人进行 Xpert 联合 T-SPOT 检测,能及早发现结核病的诊断依据并进行鉴别诊断,从而能够选择合适的抗结核治疗方案治愈 UTB 病人,避免肾功能损害及后遗症。此两种方法的联合检测对于 UTB 的临床诊断有着非常好的临床应用价值,值得广泛推广应用。但是由于此两种方法的实验室条件要求较高,在基层医院开展尚存在一定困难,因此简易便携的实验仪器和试剂是重要的研发方向。

在检测方法的比较研究中,病例的选择、样本的采集、检测试剂的厂家以及操作人员等都是可能的影响因素,因此有必要开展更严谨、人群规模更大的研究。

参考文献

- [1] FIGUEIREDO AA, LUCON AM, SROUGI M. Urogenital Tubercu-

- losis [J]. Microbiol Spectr, 2017, 5 (1) DOI: 10.1128/microbiol-spec.TNMI7-0015-2016.
- [2] Abstract -USICON 2018 [J]. Indian Journal of Urology, 2018, 34 (5): 7-72.
- [3] 高春景, 朱述阳. 支气管肺泡灌洗液行Xpert MTB/RIF检测对涂阴肺结核的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(12): 2192-2196.
- [4] 钟剑峰, 童涌, 童照威, 等. 肺泡灌洗液Xpert MTB/RIF检测在涂阴肺结核早期诊断中的应用价值[J]. 浙江医学, 2018, 40(8): 836-838, 847.
- [5] TAHERI M, BAZRAFKAN H, HABIBAGAH M. Determining the latent tuberculosis infection by IFN- γ elispot assay in healthcare workers from university hospitals of shiraz, south west of iran [J]. Iranian Red Crescent Medical Journal, 2013, 15(6): 477-482.
- [6] 宋丽娜, 于歌, 王晶莹, 等. T-SPOT.TB和CLEIA法检测结核感染的临床价值[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(12): 2110-2111.
- [7] 董颖, 陈冬, 胡新凯. 酶联免疫斑点干扰素释放试验在诊断结核病中的临床应用[J]. 安徽医药, 2017, 21(11): 2026-2028.
- [8] GERTZ MA. How to manage primary amyloidosis [J]. Leukemia, 2012, 26(2): 191-198.
- [9] PALLADINI G, MILANI P, FOLI A, et al. Melphalan and dexamethasone with or without bortezomib in newly diagnosed AL amyloidosis: a matched case-control study on 174 patients [J]. Leukemia, 2014, 28(12): 2311-2316.
- [10] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policy Statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB / RIF system for the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary TB in adults and children [S]. Geneva: World Health organization, 2013.
- [11] BAHR NC, TUGUME L, RAJASINGHAM R, et al. Improved diagnostic sensitivity for tuberculous meningitis with Xpert MTB/RIF of centrifuged CSF [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2015, 19(10): 1209-1215.
- [12] 王桂荣, 黄海荣. 分子检测技术诊断骨关节结核及其耐药性的研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(8): 674-677.
- [13] 白文静, 胡型忠, 施伎婵, 等. 外周血结核感染T细胞斑点试验在结核病中的应用价值研究[J]. 浙江医学, 2015, 37(14): 1209-1211, 1218.
- [14] 田祺, 谢永红, 徐淑凤, 等. γ -干扰素释放分析(T-SPOT.TB)在结核病诊断中的应用进展[J]. 国际呼吸杂志, 2015, 35(14): 1090-1092.
- [15] 盖林林, 管立学, 李海波, 等. 免疫性疾病患者T-SPOT.TB筛查结果及影响因素[J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(6): 82-86.
- [16] GAO L, LI X, LIU J, et al. Incidence of active tuberculosis in individuals with latent tuberculosis infection in rural China: follow-up results of a population-based, multicentre, prospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(10): 1053-1061.
- [17] 魏影. 结核感染T细胞斑点试验对结核组织病患者结核感染的诊断效果[J]. 安徽医药, 2015, 19(7): 1327-1328, 1329.

(收稿日期: 2019-03-05, 修回日期: 2019-04-27)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.01.023

◇ 临床医学 ◇

甲状腺乳头状癌 275 例气管前淋巴结转移的危险因素分析

尹晓阳^a, 王建华^a, 江晶晶^a, 徐书杭^b, 季沁^a, 周一帆^a作者单位: 南京中医药大学附属中西医结合医院, ^a普外科, ^b内分泌科, 江苏 南京 210028

通信作者: 王建华, 男, 主任医师, 副教授, 研究生导师, 研究方向为普外科疾病的临床和基础研究, E-mail: jhwang1971@163.com

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”项目(2013-WSN-603); 江苏省卫健委课题(BJ18029)

摘要: **目的** 探讨甲状腺乳头状癌气管前淋巴结转移的危险因素及其在手术决策的意义。 **方法** 研究2016年1月至2017年12月南京中医药大学附属中西医结合医院收治的275例甲状腺乳头状癌病人。分别统计其性别、年龄、肿瘤的最大直径、多灶性、侵犯被膜、伴区域淋巴结转移、伴有桥本甲状腺炎、BRAF^{V600E}基因突变等特征, 比较其与气管前淋巴结转移的关系。并制作患侧颈侧区淋巴结转移个数对诊断健侧中央区淋巴结转移的受试者工作特征ROC曲线。 **结果** 共98例(35.6%)有气管前淋巴结转移, 单因素显示病人的年龄($P=0.003$)、肿瘤长径($P<0.001$)、多灶性($P<0.001$)、侵犯被膜($P<0.001$)、伴有桥本甲状腺炎($P<0.001$)及BRAF^{V600E}基因突变($P<0.001$)与气管前淋巴结转移相关($P<0.05$); 多因素logistic回归分析示: 肿瘤长径($P<0.001$)、多发病灶($P=0.018$)、BRAF^{V600E}基因突变($P<0.001$)是气管前淋巴结转移的独立危险因素。患侧颈侧区淋巴结转移个数对诊断健侧中央区淋巴结转移的ROC曲线下面积为0.913($P<0.05$), 临界值为3(个)。 **结论** 临床病理特征对甲状腺乳头状癌气管前淋巴结转移具有一定的预测价值; 同时, 对于快速病理显示气管前淋巴结转移的单侧PTC病人, 若患侧颈侧区淋巴结转移数大于3个, 需行健侧中央区淋巴结清扫。

关键词: 甲状腺肿瘤; 淋巴结转移; 气管; 原癌基因蛋白质B-ras; 颈淋巴结清扫术; 危险因素