

## 讨论

IL-8 是 CXC 细胞因子家族成员,是介导炎症反应的主要细胞因子。IL-8 主要功能是趋化多种免疫细胞至感染部位吞噬并杀伤病原菌。同时,在感染部位也会进一步导致细胞脱粒,通过活化 NADPH 氧化酶促进超氧化物和  $H_2O_2$  的形成,并引发呼吸爆发。肺结核是一种由 Mtb 引起的传染性疾病,因此发病期间病原菌感染及组织病理损伤都会引起感染部位 IL-8 的高表达。在体外培养实验中,多种免疫细胞只有在 Mtb 刺激时才会产生大量的 IL-8,而没有刺激时 IL-8 表达量很低<sup>[4-6]</sup>。免疫组化结果表明,肺结核患者淋巴结及肉芽肿组织中均有 IL-8 表达<sup>[4]</sup>。在临床样本检测中,结核病患者支气管灌洗液、外周血 B 细胞、外周血单核细胞等样品中 IL-8 表达量均高于正常人的样品<sup>[7-9]</sup>。此外,因结核病死亡的患者血浆中 IL-8 比存活的患者有显著提高<sup>[8]</sup>。这些结果提示,IL-8 表达与 Mtb 感染、结核病发病以及结核病严重程度相关。但是,IL-8 表达与肺结核转归及治愈之间是否存在相关性,能否成为评估指标还需要进一步研究。因此,本研究纳入了不同临床背景肺结核患者与健康人,不同病程肺结核患者,探讨了 IL-8 表达变化与肺结核转归及治愈之间的相关性。

在比较健康人、病情缓和的肺结核患者以及病情严重的肺结核患者外周血 IL-8 表达水平时,笔者发现用 PBS 处理的血液样品中 IL-8 表达在三组中没有显著变化( $P > 0.05$ ),而用 Mtb 总蛋白刺激后的血液样品三组之间呈现显著的不同( $P < 0.05$ ),且 IL-8 表达水平与病情严重程度正相关(图 1)。这个结果表明,结核病患者外周血 IL-8 本底表达与病情严重程度没有相关性,但是针对 Mtb 抗原刺激后的 IL-8 表达水平是有相关性的。一般认为,外周血细胞中对 IL-8 表达起主要贡献作用的是单核细胞。笔者在前期工作中纳入了 769 例健康人及 547 例结核病患者,检测了两组外周血细胞中的单核细胞数量。结果显示,肺结核患者平均值为  $(0.45 \pm 0.17) \times 10^6$  个/ml,健康人平均值为  $(0.38 \pm 0.11) \times 10^6$  个/ml。在本研究中肺结核患者 IL-8 表达量平均值为  $(39.6 \pm 52.2)$  ng/ml,健康人 IL-8 表达量平均值为  $(7.1 \pm 6.3)$  ng/ml。虽然肺结核患者相比健康人单核细胞数量提高 1.2 倍,但是 IL-8 表达量确升高 5.6 倍。因此,笔者认为肺结核患者外周血单核细胞对于 Mtb 抗原刺激更敏感,IL-8 诱导表达量更高。

笔者还纳入了 8 个肺结核患者,跟踪观察了治疗前、治疗中以及治愈后外周血 IL-8 表达水平变化。结果显示,肺结

核患者在发病期 IL-8 表达量均处于高位,而治愈后 IL-8 表达显著降低,回到健康人的表达水平(图 2)。因此,笔者认为 IL-8 与肺结核治愈状态相关。

综上所述,本研究结果表明 Mtb 抗原刺激后的外周血 IL-8 表达水平与肺结核病情严重程度相关,且与肺结核发病状态及治愈状态相关,具有成为评估肺结核病情转归新指标的良好前景。

## 参考文献

- [1] 张慧,姜世闻,王黎霞. 我国结核病防治工作形势分. 中国医学科学院学报. 2009, 31(4): 393-395.
- [2] Wu B, Huang C, Kato-Maeda M, Hopewell PC, et al. Messenger RNA expression of IL-8, FOXP3, and IL-12beta differentiates latent tuberculosis infection from disease. J Immunol, 2007, 178(6):3688-3694.
- [3] Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B, et al. The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody. J Immunol, 1995, 155(4):2151-2157.
- [4] Ferrero E, Biswas P, Vettoretto K, et al. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. Immunology, 2003, 108(3):365-374.
- [5] Sawant KV, McMurray DN. Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. Infect Immun, 2007, 75(4):1870,1877.
- [6] Sadik CD, Hunfeld KP, Bachmann M, et al. Systematic analysis highlights the key role of TLR2/NF-B/MAP kinase signaling for IL-8 induction by macrophage-like THP-1 cells under influence of *Borrelia burgdorferi* lysates. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(11):2508-2521.
- [7] Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(6):467,477.
- [8] Vani J, Shaila MS, Rao MK, et al. B lymphocytes from patients with tuberculosis exhibit hampered antigen-specific responses with concomitant overexpression of interleukin-8. J Infect Dis, 2009, 200(3):481-482.
- [9] Wu B, Huang C, Kato-Maeda M, et al. Messenger RNA expression of IL-8, FOXP3, and IL-12beta differentiates latent tuberculosis infection from disease. J Immunol, 2007, 178(6):3688-3694.

## 实时荧光核酸恒温扩增检测技术在肺结核临床诊断中的价值研究

张娟 孙炳奇 李莹 孙秀华 马静红 孙娇 王悦 邢黎莉

(110044 沈阳市胸科医院结核病实验室)

**摘要 目的** 用实时荧光核酸恒温扩增检测技术检测痰标本中的 Mtb,并评估其用于结核病诊断的价值。**方法** 173 份痰液标本取自沈阳市胸科医院的肺结核患者,分别用金胺“O”荧光染色、实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)和 MGIT 960 培养法检测。采用 McNemar 检验比较三种方法对结核患者的阳性检出率。**结果** 173 例入组肺结核患者痰标本中,SAT 法对 TB 的检出率为 49.1%,高于金胺“O”荧光染色法(34.1%, $P < 0.001$ )和 MGIT 960

培养法(40.5%,  $P = 0.017$ )。而 MGIT 960 培养法与金胺“O”荧光染色法的检出率差异没有统计学意义( $P = 0.207$ )。其中, SAT 法与金胺“O”荧光染色法结果符合率为 69.94% (121/173), SAT 法与 MGIT 960 培养法的符合率为 79.77% (138/173)。**结论** SAT 法可以作为临床对结核病的辅助诊断方法。

**关键词** 实时荧光核酸恒温扩增检测技术; 结核; 诊断

**基金项目** 沈阳市科技计划项目(F12-255-1-00)

**通信作者** 孙炳奇, Email: sunbq2004@163.com

结核病又称为痨病,是由结核分枝杆菌引起的一类呼吸道传染性疾病,严重危害人们的身体健康。中国是全球结核病高发的国家之一,2010 年全国第 5 次结核病流行病学调查显示,我国活动性肺结核患病率为 459/10 万,其中传染性肺结核患病率为 66/10 万<sup>[1]</sup>。结核分枝杆菌(Mtb)检测是结核病诊断的重要依据,结核病患的快速诊断在提高患者的生活质量以及减少结核病传播方面有着重要的意义。目前,临床工作中对结核分枝杆菌常用的检测方法有涂片抗酸染色法和培养法。涂片抗酸染色法,操作简单,但敏感度低和特异度较低;培养法是结核病诊断的金标准,然而耗时较长,无法满足快速诊断的要求。随着分子生物学的发展,尤其是 PCR 技术的广泛应用,结核病的快速诊断成为可能。实时荧光核酸恒温扩增检测技术(Simultaneous Amplification and Testing, SAT)是近年来在 PCR 基础上发展而来的针对 RNA 的检测技术<sup>[2]</sup>,本研究采用 SAT 技术对临床痰液样本进行检测,并与金胺“O”荧光染色、BD960 液体培养法法进行对比,以评估 SAT 技术在肺结核临床诊断中的价值。

#### 材料和方法

1. 临床样本来源:2012 年 12 月至 2013 年 3 月期间在沈阳胸科医院住院治疗的疑似肺结核患者的痰液标本共 173 例,其中男性 114 例(65.9%),女性 59 例(34.1%);年龄最小 13 岁,最大 89 岁,中位值为 53 岁。

2. 样本采集:患者晨起立即用清水漱口后,咯出痰液,量约 5 ml,根据我国《结核病诊断细菌学检验规程》进行处理,并将标本分为 3 份,一份用于涂片检查,一份进行 TB-SAT 检测,一份用于 MGIT 960 液体培养。

3. 主要试剂及仪器:分枝杆菌细胞破碎仪(超声功率 300W),西安天隆 TL-988 型 PCR 仪, TB-SAT 购自自上海仁度生物科技有限公司; Bactec MGIT 960 分析仪; Bactec MGIT 试剂盒购自)购自碧迪医疗器械上海有限公司。

4. 检测方法:痰涂片抗酸染色法(金胺 O)按照中华人民共和国卫生行业标准(WS288—2008)进行, SAT 法及 D960 液体培养法分别按照产品说明书进行操作。

5. 统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析

#### 结果

1. TB-SAT 检测、金胺“O”荧光染色、BD 960 检测阳性率:173 例确诊肺结核的患者中,通过 TB-SAT 法检测出 85 例患者阳性(49.13%);通过金胺“O”荧光染色法检出 59 例患者阳性(34.1%);通过 MGIT 960 培养法检测出 70 例患者阳性(40.46%)。TB-SAT 法对肺结核的阳性检出率明显高

于金胺“O”荧光染色法和 MGIT960 培养法。

2. SAT-TB 与金胺“O”荧光染色检测结果比较:TB-SAT 检测方法与金胺“O”荧光染色相比,两种方法总符合率为 69.94% (0.6311, 0.7677)。两种方法的检出率通过 McNemar 检验: $P < 0.001$ ,差异具有统计学意义(表 1)。

表 1 SAT-TB 与金胺“O”荧光染色检测结果比较

比较项目及结果	金胺 O 染色		合计
	阳性	阴性	
SAT			
阳性	46	39	85
阴性	13	75	88
合计	59	114	173

3. SAT-TB 与 MGIT 960 培养法检测结果比较:TB-SAT 法与 MGIT960 培养法相比两种方法总符合率为 79.77% (0.7378, 0.8576),两种方法的检出率通过 McNemar 检验: $P = 0.017$ ,差异性具有统计学意义(表 2)。

表 2 SAT-TB 与 MGIT 960 培养法检测结果比较(例)

比较项目及结果	BD 960 检测		合计
	阳性	阴性	
TB-SAT 检测			
阳性	60	25	85
阴性	10	78	88
合计	70	103	173

4. MGIT 960 培养法与金胺“O”荧光染色检测结果比较:MGIT 960 培养法与金胺“O”荧光染色相比,两种方法的总符合率为总符合率 63.58% (0.5641, 0.7075)。两种方法的检出率 McNemar 检验: $P = 0.207$ ,差异没有统计学意义(表 3)。

表 3 MGIT 960 培养法与金胺“O”荧光染色检测结果比较(例)

比较项目及结果	金胺“O”荧光染色		合计
	阳性	阴性	
MGIT 960			
阳性	33	37	70
阴性	26	77	103
合计	59	114	173

#### 讨论

临床检验工作中能够快速查出结核病患者标本中的结核分枝杆菌,对于结核病的诊断及快速阻断结核病的传播有重要意义。目前临床实践中常用的方法是涂片抗酸染色法和培养法。涂片抗酸染色法,操作简单,但敏感度低和检出

率较低<sup>[3-4]</sup>,且不能辨别活菌和死菌。培养法是结核病诊断的金标准,但往往需要 1 到 2 个月的时间<sup>[5]</sup>,无法满足快速诊断的要求。随着分子生物技术的发展,尤其是 PCR 技术,以其灵敏、特异、快速的特点而广泛应用于临床检测<sup>[6-8]</sup>。实时荧光核酸恒温扩增检测技术(Simultaneous Amplification and Testing, SAT)是以 Mtb 特异的 16srRNA 为检测靶标,同一温度下,首先通过 M-MLV 反转录酶产生靶标核酸(RNA)的一个双链 DNA 拷贝,然后利用 T7 RNA 多聚酶从该 DNA 拷贝上产生多个(100~1000 个)RNA 拷贝;每一个 RNA 拷贝再从反转录开始进入下一个扩增循环;同时,带有荧光标记的探针和这些 RNA 拷贝特异结合,产生荧光,从而快速准确地判断待检样本中是否有 Mtb 存在。

运用 SAT 技术检测结核病患者痰液标本中是否存在 Mtb 已被很多研究者所采用,研究显示 SAT 技术检测患者痰液标本的敏感度和特异度均高于 80%<sup>[2,9-10]</sup>,敏感度和特异度已得到证实,因此本研究未作其敏感度和特异度的研究。本研究中我们将 SAT 技术用于临床痰液标本中的 Mtb 的检测,并将检测结果与金胺“O”荧光染色和 MGIT 960 培养法的检出率进行比较。入组患者共 173 例,经临床确诊为肺结核,结果显示,SAT 法、MGIT 960 培养法和金胺“O”荧光染色的检出率分别为 49.13%、40.46% 和 34.1%,SAT 法的检出率高于其他两种方法,这与既往的研究相符合<sup>[9-11]</sup>。表 2 中显示 TB-SAT 检测阳性,而 MGIT 960 检测阴性有 25 例;TB-SAT 检测阴性,而 MGIT 960 检测阳性有 10 例,可能原因是,TB-SAT 不仅能区分活菌和死菌,还能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌,而 MGIT 960 培养法不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌。结核分枝杆菌的细菌学检测主要包括痰涂片和痰菌培养药物敏感性试验及菌型鉴定,痰涂片抗酸染色查找抗酸杆菌作为细菌学检测的常规手段之一,简便快捷是其优点,但检出率低,而且标本的选取、涂片的质量以及显微镜检测速度等人为因素都会较大地影响痰检质量,阳性率仅 30% 左右<sup>[3-4]</sup>。若以痰涂片抗酸染色作为依据,则肺结核患者中将有 2/3 以上为涂片阴性结果,很容易造成误诊和漏诊。本研究 173 例结核患者中,涂阴患者共 114 例(65.90%),其中通过 SAT 法检测呈阳性 39 例(34.21%),通过 MGIT 960 培养法呈阳性 37 例(32.46%),SAT 法也呈现出一定的优势。另外,在入组的结核病患者中,初诊患者共 64 例,其中涂片金胺“O”荧光染色、MGIT 960 培养法和 SAT 法检测呈阳性结果的分别是 20 例(31.25%)、25 例(39.06%)和 34 例(53.13%),显示出 SAT

法能够显著提高初诊患者的检出率。

肺结核目前的诊断方法很多,每一种方法的检出率有所不同,并且每一种方法都存在一定程度的误诊率和漏诊率,尤其是涂阴肺结核的诊断,有必要采取高敏感度的方法进行进一步的检测,综合各方面信息才能得出真实准确的诊断结果。SAT 法具有较高的敏感度和特异度,以 16srRNA 为检测靶点,扩增产物亦是 RNA,容易降解,可以有效控制实验室污染,提高检测的准确性,这是其他以 DNA 为靶点的检测方法所不具备的优势,并且 SAT 法操作简单,核酸提取及扩增检测整个流程只需 2 h,缩短了患者从确诊到治疗的时间,降低了结核病的传播风险,为患者的治疗争取了宝贵的时间。综上所述,SAT 法可以作为一种有效的肺结核辅助诊断方法。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线词查报告(2007—2008 年). 北京:人民卫生出版社.
- [2] Zhenglin C, Yongzhong W, Ling F, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3):646-50.
- [3] 冯岚,付军,张媛媛,等. 金胺 O 荧光染色与抗酸染色用于结核病痰标本检测的初步分析. *中国预防医学杂志*, 2009, 10(6):537-539.
- [4] 王成勇,李益荣. 3479 例肺结核病人痰标本抗酸杆菌检查结果分析. *临床肺科杂志*, 2004, 9(6):605-606.
- [5] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京:中同教育文化出版社, 2006:36.
- [6] Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol*, 1996, 34:2522-2525.
- [7] Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 2006, 61:783-790.
- [8] Speers DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin Biochem Rev*, 2006, 27(1):39-51.
- [9] 王永忠,张宏宇,刘小琴,等. 痰液标本结核分枝杆菌 RNA 恒温扩增检测及临床应用. *山东医药*, 2011, 51(41):83-84.
- [10] 崔振玲,沙巍,黄晓辰,等. RNA 恒温扩增技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(12):894-897.
- [11] 倪丽丽,罗柳林,景玲杰,等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值. *中华检验医学杂志*, 2012, 35(8):702-705.

## 96 例耐多药肺结核患者下呼吸道感染的菌种分布及耐药性分析

宋晓东 朱红 黄晓磊 顾晓峰 张璐

(116031 大连市结核病医院)

**摘要** 目的 分析耐多药肺结核患者下呼吸道感染的致病菌及耐药性。方法 选取我院 2009—2012 年间确诊的耐多药肺结核患者的痰和(或)支气管肺泡灌洗液进行培养。结果 有 96 例耐多药肺结核合并下呼吸道感染,检出致病菌 115 株。G<sup>-</sup> 菌共 73 株,占 63.5%,其中以肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌等条件致病菌检出率较高;对