

# 荧光定量PCR技术检测肺外结核患者样本临床应用

宋江勤<sup>1</sup> 向健<sup>1</sup> 杨昊<sup>2</sup> 周锦<sup>3</sup>

**【摘要】目的** 评估赛沛分子检测技术(结核分枝杆菌和利福平耐药基因)(GeneXpert MTB/RIF)检测心包和胸腔积液样本中结核分枝杆菌的有效性。**方法** 收集2015年1月至2017年6月天门市第一人民医院和汉川市人民医院收治的286例结核病疑似患者的临床资料,分别收集158例胸腔积液和128例心包积液样品。每个样品均经过抗酸染色涂片镜检、罗氏培养基结核分枝杆菌培养(LJ培养)和GeneXpert MTB/RIF测定。使用结核分枝杆菌罗氏培养作为金标准,评估GeneXpert MTB/RIF技术检测MTB的有效性。**结果** 在286例积液样本中,MTB通过LJ培养阳性者51例(17.8%),GeneXpert MTB/RIF测定阳性者43例(15%),抗酸染色镜检阳性者11例(3.8%)。GeneXpert技术灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为84.3%、100%、100%和96.7%,抗酸染色方法的灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为18.3%、99.1%、81.8%和85.4%。GeneXpert技术检查心包积液中MTB的灵敏度可达90%。GeneXpert MTB/RIF和抗酸染色镜检鉴定两种样本中结核分枝杆菌有效性的差异具有统计学意义( $\chi^2 = 233.199$ 、 $33.715$ 、 $P$ 均 $< 0.001$ )。**结论** GeneXpert MTB/RIF技术对于检测胸腔和心包积液中的MTB具有高灵敏度和高特异性。

**【关键词】** 结核性胸膜炎; 结核性心包炎; 赛沛分子检测技术(结核分枝杆菌和利福平耐药基因); 肺外结核

**Clinical application of fluorescent quantitative PCR in detection of patients with extra-pulmonary tuberculosis** Song Jiangqin<sup>1</sup>, Xiang Jian<sup>1</sup>, Yang Hao<sup>2</sup>, Zhou Jin<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Clinical Laboratory, Tianmen First People's Hospital, Tianmen 431700, China; <sup>2</sup>Public Health Department, Hanchuan People's Hospital, Hanchuan 432300, China; <sup>3</sup>Clinical Laboratory, Tianmen Center for Diseases Control and Prevention, Tianmen 432300, China

Corresponding author: Song Jiangqin, Email: mainx@qq.com

**【Abstract】Objective** To evaluate the effect of GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampin (GeneXpert MTB/RIF) in detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pericardial and pleural effusion samples. **Methods** From January 2015 to June 2017, data of 286 suspected cases with tuberculosis were collected from The First people's Hospital and Hanchuan People's Hospital. There were 158 cases with pleural effusion and 128 cases with pericardial effusion, respectively. Each sample was examined by acid fast staining, smear microscopy, LJ Culture and GeneXpert MTB/RIF assay, respectively. Taking *Mycobacterium* LJ culture as the gold standard, the effect of GeneXpert MTB/RIF in detecting MTB was evaluated. **Results** Among the 286 effusion samples, 51 (17.8%) were MTB positive for LJ cultured, 43 (15%) were MTB positive determined by GeneXpert MTB/RIF, and 11 (3.8%) were MTB positive detected by acid-fast stain microscopy. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of GeneXpert technology were 84.3%, 100%, 100% and 84.3%, respectively; while those of the acid fast stain method were 18.3%, 99.1%, 81.8% and 99.1%, respectively. The sensitivity of MTB in pericardial effusion was up to 90% detected by GeneXpert. GeneXpert MTB/RIF and acid-fast stain microscopy showed significant difference in the identification of *Mycobacterium tuberculosis* in two samples ( $\chi^2 = 233.199$ ,  $33.715$ ; all  $P < 0.001$ ).

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.03.010

作者单位: 431700 天门市, 天门市第一人民医院检验科<sup>1</sup>; 432300 汉川市, 汉川市人民医院公共卫生科<sup>2</sup>; 431700 天门市, 天门市疾病预防控制中心检验科<sup>3</sup>

通信作者: 宋江勤, Email: mainx@qq.com

**Conclusion** GeneXpert MTB/RIF technology has high sensitivity and specificity on detecting MTB in pleural effusion and pericardial effusion.

**【Key words】** Tuberculous pleurisy; Tuberculous pericarditis; GeneXpert *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampin; Extrapulmonary tuberculosis

目前,结核病仍是世界范围内发病率和病死率较高的疾病之一。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)统计,自1990年以来,结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)快速诊断技术和有效的抗结核病治疗使病死率降低了47%,但在发展中国家结核病仍是导致病患死亡的主要疾病之一。尽管分子诊断技术在MTB方面已取得了较大进步,但减少和根除结核病(tuberculosis, TB)仍是临床医生的远期目标<sup>[1]</sup>。

MTB感染导致结核病本身呈现出两种形式,即肺结核(pulmonary tuberculosis, PTB)或肺外结核病(extra-pulmonary tuberculosis, EPTB)。肺结核是最常见形式,而EPTB累及淋巴结、骨、关节、肾、肠、腹膜、胸膜、心包和脑膜等<sup>[2]</sup>。本研究旨在评估赛沛分子检测技术(结核分枝杆菌和利福平耐药基因, *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampin, GeneXpert MTB/RIF)于心包和胸腔积液样本中检测结核分枝杆菌的有效性,现报道如下。

## 资料与方法

### 一、入组患者的一般资料

2015年1月至2017年6月,天门市第一人民医院和汉川市人民医院感染科共收治疑似结核病患者286例,其中胸腔积液样本158份,心包积液标本128份。其中男性177例,女性109例,患者年龄16~87岁,平均年龄为43.6岁。

286例疑似结核患者的筛选条件包括:①患者的临床表现;②实验室检查结果(抗酸染色、GeneXpert和罗氏培养以外的项目);③超声心动图检查结果;④影像学检查结果。排除既往已确诊的结核病患者和正在接受抗结核分枝杆菌治疗的患者。

### 二、仪器与试剂

GeneXpert MTB/RIF系统由美国Cepheid公司生产,试剂盒原装进口,所有试剂均在有效期内使用。

### 三、研究方法

#### 1. 标本检测:由临床医师行胸腔或心包穿刺

术,抽取胸腔或心包积液送检,实验室人员接收标本后,置于离心管集菌离心3 000 r/min、30 min(离心半径 $r = 10\text{ cm}$ ),弃去上清液留取沉淀物5 ml,混匀备用。首先从5 ml沉淀物中吸取0.05~0.1 ml涂片,涂抹范围10 mm × 20 mm,抗酸染色并镜检,按《痰涂片镜检质量保证手册》<sup>[3]</sup>操作。另取3 ml沉淀物加入等量4%氢氧化钠处理15 min,按《分枝杆菌分离培养标准化程序及质量保证手册》<sup>[4]</sup>要求进行分枝杆菌分离培养。再取1 ml沉淀物放在防漏收集器皿中,加入处理液2 ml,盖紧剧烈摇动10次,室温处理15 min后,用无菌吸管吸取2 ml,加入GeneXpert MTB/RIF Cartridge标本孔中,注意防止产生气泡,盖紧盖子后上机开始测试,结果报告MTB和利福平耐药是否检出。

2. 结果判定:抗酸染色镜检根据涂片菌量判为4+、3+、2+、1+、阴性。培养基斜面无肉眼可见菌落生长为阴性,培养基斜面有肉眼可见菌落生长为阳性。GeneXpert MTB/RIF结果判断依照探针的循环阈值(Ct值),当内对照探针Ct值 $\leq 38$ 即为阳性,5个探针中至少2个探针Ct值 $\leq 38$ 即为检测到MTB,可进一步按照Ct值对MTB进行半定量,Ct值 $< 16$ 为高含量,Ct值16~22为中含量,Ct值22~28为低含量,Ct值 $> 28$ 为极低含量<sup>[5]</sup>;GeneXpert MTB/RIF法检测利福平耐药的基础在于MTB特异性分子信标早期Ct值和晚期Ct值之差,即 $\Delta\text{Ct}$ 值,当 $\Delta\text{Ct}$ 值 $> 3.5$ 时提示对利福平耐药,当 $\Delta\text{Ct}$ 值 $\leq 3.5$ 时对利福平敏感<sup>[6]</sup>。

3. 质量控制:抗酸染色检查每批样本均进行阳性片和阴性片对照,每张涂片由两名经验丰富的实验室技术人员使用显微镜进行检查。罗氏结核分枝杆菌培养采用美国ATCC H37rv作阳性对照菌株,无菌蒸馏水作阴性对照。GeneXpert MTB/RIF法每个测试进行样品处理质控和探针检查质控。

### 四、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计,用敏感性、特异性、阳性预测值(positive predictive value, PPV)和阴性预测值(negative predictive value, NPV)比较Gene Xpert和抗酸染色两种方法在诊断结核分枝杆菌的有效性。参考李立明主编《流行病

学》<sup>[7]</sup>设立金标准。组间比较采用 $\chi^2$ 检验,以 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

## 结 果

### 一、三种检测方法的阳性检出率

286个样本中,罗氏结核分枝杆菌培养阳性标本51个(17.8%),GeneXpert检测阳性标本43个(15%),而通过抗酸染色检查阳性样本11个(3.8%),见表1;GeneXpert技术与罗氏培养阳性检出数见表2。

### 二、GeneXpert技术鉴定MTB的有效性

本研究中GeneXpert技术对心包积液样本的敏感性为72.2%,特异性为100%,而对胸腔积液的敏感性为84.3%,特异性为100%。GeneXpert技术对诊断两种积液中结核分枝杆菌的总体敏感性为84.3%,特异性为100%,阳性预测值为100%,阴性预测值为96.7%,见表3。

表1 3种方法检测158例胸腔积液和128例心包积液样本阳性检出率

检测方法	胸腔积液(158例)	心包积液(128例)	合计(286例)
抗酸染色	8(5.06)	3(2.34)	11(3.85)
GeneXpert	30(18.99)	13(10.16)	43(15.04)
罗氏培养	33(20.89)	18(14.06)	51(17.83)

### 三、抗酸染色镜检技术鉴定MTB有效性

抗酸染色镜检对心包积液样本的敏感性为21.8%,特异性为99.2%,阳性预测值为87.5%,阴性预测值为83.3%,而对胸腔积液样本的敏感性仅为11.7%,特异性为99.0%,阳性预测值为66.6%,阴性预测值为88%,详见表4;抗酸染色方法鉴定两种积液中结核分枝杆菌的有效性见表5。

## 讨 论

WHO在2012年报告约960万例结核病患者,其中约144万例(占15%)患者为EPTB,而欧洲疾病预防控制中心报告,欧洲约22%结核病患者为EPTB<sup>[8]</sup>。其中结核性胸膜炎占EPTB的第二位<sup>[9]</sup>,Tahseen等<sup>[10]</sup>报道1%~8% EPTB患者为结核性心包炎。

结核性胸膜炎和心包炎的实验室诊断常规方法包括抗酸染色镜检和罗氏培养法,抗酸染色镜检具有快速和收费低等特点,但对EPTB诊断的敏感度很低,本研究中抗酸染色对胸腔积液和心包积液的敏感度分别为11.7%和21.8%,显著低于GeneXpert的敏感度(72.2%和90.0%)。另外,罗氏培养法是检测结核分枝杆菌的金标准,但是其培养周期需要2~6周,对实验室工作人员技术和生物安全防护等级要求高,需要达到生物安全三级实验

表2 GeneXpert技术与罗氏培养检测结果(例)

样本类型	GeneXpert	罗氏培养		合计
		阳性	阴性	
胸腔积液	阳性	13	0	13
	阴性	5	110	115
	合计	18	110	128
心包积液	阳性	30	0	30
	阴性	3	125	128
	合计	33	125	158
两者合计	阳性	43	0	43
	阴性	8	235	243
	总计	51	235	286

表3 GeneXpert技术鉴定两种积液中结核分枝杆菌的有效性

样本类型	$\chi^2$ 值	P值	灵敏度(%)	特异性(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)
胸腔积液	88.425	<0.001	72.2	100.0	100.0	95.6
心包积液	140.270	<0.001	90.0	100.0	100.0	97.6
两者合计	233.199	<0.001	84.3	100.0	100.0	96.7



表 4 抗酸染色镜检技术与罗氏培养阳性例数（例）

样本类型	抗酸染色	罗氏培养		合计
		阳性	阴性	
胸腔积液	阳性	2	1	3
	阴性	15	110	125
	合计	17	111	128
心包积液	阳性	7	1	8
	阴性	25	125	150
	合计	32	126	158
两者合计	阳性	9	2	11
	阴性	40	235	275
	合计	49	237	286

表 5 抗酸染色在两种积液中鉴定结核分枝杆菌的有效性

样本类型	卡方值	P值	灵敏度（%）	特异性（%）	阳性预测值（%）	阴性预测值（%）
胸腔积液	7.602	0.006	11.7	99.0	66.6	88.0
心包积液	23.594	<0.001	21.8	99.2	87.5	83.3
两者合计	33.715	<0.001	18.3	99.1	81.8	85.4

室水平，受以上因素限制，在绝大多数基层医疗机构，结核分枝杆菌培养未能作为常规检测方法。

肺外结核的分子诊断技术得以快速发展，其阳性预测值高达98%~99%<sup>[11-12]</sup>，本研究中GeneXpert MTB/RIF技术对于胸腔积液和心包积液的阳性预测值达到100%，其他研究显示GeneXpert MTB/RIF技术在非呼吸道标本中诊断结核病的敏感性并不一致，但特异性均较高<sup>[13-15]</sup>，与本研究结果一致，提示采用GeneXpert MTB/RIF技术诊断结核性胸膜炎和心包炎患者样本可靠。

GeneXpert MTB/RIF分子诊断技术是一种自动化实时聚合酶链反应（PCR）核酸扩增技术，通过检测结核分枝杆菌的特定靶向基因或者基因片段，将检测周期从几周缩短至2 h。GeneXpert MTB/RIF检测系统是一种全封闭的检测系统，具有生物安全风险低的特点，另外其为基于分析软件的自动报告系统，该检测系统自动化程度高；但GeneXpert技术对实验室的设施环境要求较高，仪器成本高，检测成本也较高，故在基层医疗机构难以推广。

目前在结核分枝杆菌感染的实验室诊断技术方面还有T-SPOT.TB技术，T-SPOT.TB在低风险人群中检测的特异度较好，而在有潜在结核分枝杆菌感染的高危人群中检测特异度显著降低，在结核性浆膜腔积液中检测的敏感度较高，与PPD、抗酸杆菌涂片相比，敏感度较高，但对鉴别是否为活动性结核病并不理想。

另有研究表明患者年龄、性别等一般资料及免疫抑制状态、恶性肿瘤等基础疾病均为T-SPOT.TB试验结果的影响因素，故T-SPOT.TB在诊断结核病方面存在一定局限性。

大量文献报道已经证实关于GeneXpert技术对包括结核性胸膜炎在内的EPTB诊断的有效性<sup>[18-20]</sup>。但少有文献报道关于GeneXpert技术在结核性心包炎诊断的有效性。因此，本研究重点突出了GeneXpert MTB/RIF技术在检测EPTB结核分枝杆菌中的优势，是一种操作简便、快速、敏感度和特异度高且对操作人员安全的检测技术，该技术的应用对结核性胸膜炎早期诊断和治疗具有重大意义。

参 考 文 献

[1] Liebenberg JJ, Dold CJ, Olivier LR. A prospective investigation into the effect of colchicine on tuberculous pericarditis:cardiovascular topics[J]. Cardiovasc J Afr 2016,27(6):350-355.

[2] Iram S, Zeenat A, Hussain S, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis using Xpert MTB/RIF assay--Report from a developing country[J]. Pak J Med Sci 2015,31(1):105-110.

[3] 中国疾病预防控制中心. 痰涂片镜检质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社,2004:8-17.

[4] 赵雁林, 王黎霞, 成诗明, 等. 分枝杆菌分离培养标准化程序及质量保证手册[M]. 北京: 人民卫生出版社,2013:26-30.

[5] Lawn SD, Nicol MP. Xpert MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance[J]. Future Microbiol, 2011,6(9):1067-1082.

[6] Blakemore R, Story E, Helb D, et al. Evaluation of the

- analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(7): 2495-2501.
- [7] 李立明主编. 流行病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 7.
- [8] World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual Technical and operational 'how-to': practical considerations[EB/OL]. Geneva: WHO, 2014. <http://www.who.int/tb/publications/tb-amplificationtechnology-implementation/en/>.
- [9] Chihota V, Grant A, Fielding K, et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(8): 1024-1031.
- [10] Tahseen S, Qadeer E, Khanzada F, et al. Use of Xpert® MTB/RIF assay in the first national antituberculosis drug resistance survey in Pakistan[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(4): 448-455.
- [11] World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children[EB/OL]. Geneva: WHO, 2013. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/112472>.
- [12] Denkinger CM, Schumacher SG, Boehme CC, et al. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and metaanalysis[J]. ERJ, 2014, 44(2): 435-446.
- [13] Causse M, Ruiz P, Gutierrez-Aroca JB, et al. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extra pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 3065-3067.
- [14] Hillemann D, Riisch-Gerdes S, Boehme C, et al. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1202-1205.
- [15] Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an Ls6110-Taqman real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1772-1776.
- [16] 王立红, 付秀华, 张桂芝, 等. 结核感染T细胞斑点试验在结核病诊断中的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(12): 992-996.
- [17] 卢青纯, 唐小燕, 熊恬园, 等. T-SPOT.TB试验在活动性结核诊断中的价值及其影响因素分析[J]. 中国循证医学杂志, 2014, 14(5): 522-526.
- [18] 陈子芳, 孙本海, 霍丽丽, 等. GeneXpert MTB/RIF技术在结核性胸膜炎诊断及利福平耐药检测中的价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(6): 819-821.
- [19] 曹玲. 荧光定量PCR法与涂片抗酸染色对胸水结核杆菌灵敏度及特异性的比较[J]. 中华全科医学, 2015, 13(8): 1315-1316.
- [20] 孙庆. 荧光定量聚合酶链反应快速检测胸腹水抗酸杆菌的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1479-1481.
- (收稿日期: 2017-02-27)  
(本文编辑: 孙荣华)

宋江勤, 向健, 杨昊, 等. 荧光定量PCR技术检测肺外结核患者样本临床应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(3): 251-255.