

· 技术与方法 ·

GeneXpert 法与涂片抗酸染色法检测结核分枝杆菌的比较研究

张海霞,张 覓,腾晓燕,刘冰雪,肖园园,黄 菁

南京中医药大学附属南京医院(南京市第二医院)检验检测中心,江苏 南京 210003

[摘要] 目的:比较 GeneXpert 法和涂片抗酸染色法在多种样本来源的结核分枝杆菌检测中的准确性及有效性,为结核病的诊断和治疗提供依据。方法:用 GeneXpert 法和涂片法对 766 份结核及疑似结核患者的标本进行结核分枝杆菌检测,其中 460 例同步进行了结核培养,并对各种方法的检出阳性率进行比较。结果:766 份标本分别用涂片法和 GeneXpert 法进行检测,涂片法的总体阳性率为 24.0%,GeneXpert 法的总体阳性率为 40.1%,两者差异具有统计学意义($\chi^2=85.47, P < 0.001$)。对不同标本类型的检测结果进行统计分析,473 例痰液的涂片法和 GeneXpert 法阳性率分别为 29.4%和 39.1%($\chi^2=24.60, P < 0.01$);185 例灌洗液涂片和 GeneXpert 阳性率分别为 21.1%和 53.0%($\chi^2=47.68, P < 0.01$);61 例胸腹水涂片和 GeneXpert 阳性率分别为 3.3%和 19.7%($\chi^2=8.10, P < 0.01$);47 例其他标本类型(包括尿液、脑脊液、大便、脓液等)涂片和 GeneXpert 阳性率分别为 8.5%和 25.5%($\chi^2=6.13, P < 0.05$);各种标本类型两种方法检测结果的差异均具有统计学意义。766 份标本中两方法合并阳性率为 43.6%。对其中的 460 例标本同时进行结核分枝杆菌培养,涂片法、GeneXpert 法和培养法的阳性率分别为 28.5%、47.0%和 35.4%,3 种方法之间两两比较均存在显著性差异。结论:GeneXpert 法检测各种标本的阳性率明显高于涂片法,能更好地为临床结核病的诊断提供实验室依据。

[关键词] GeneXpert 法;抗酸染色;结核分枝杆菌;比较研究

[中图分类号] R378.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)01-129-04

doi:10.7655/NYDXBNS20220125

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染病,由于耐药菌株的产生和社会流动人口的增多等生物学和社会学因素,结核病已经成为严重危害人类健康的公共卫生问题。据 WHO 报道,目前我国仍为结核病高负担国家之一,2017 年估算发病 91 万(全球总发患者数排第 2 位的国家),实际登记发病 77.8 万,约 13.2 万患者被遗漏,而我国登记的结核患者中有病原依据的仅为 31%^[1]。因此如何快速而准确地为临床提供病原学依据是结核患者发现、诊断的最重要步骤之一,是结核病防治的重要前提^[2]。目前,结核病的病原学诊断主要依靠分枝杆菌的涂片法、培养和药敏试验等传统的实验室检查技术。涂片法灵敏度低、培养法耗时长,且不能区分结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌,不能满足临床诊疗的需求,迫切需要引进新技术优化结核病的诊断。2018 年 5 月开始实行的肺结核诊断指南中将结核分枝杆菌的分子生物学阳性作为结核病确诊依据^[3]。GeneXpert 系统使用实时定量 PCR 原理,整合并自动进行样品纯化、核酸扩增、单一或复杂样品中的目标序列测定。GeneXpert 系统使用一次性的 Xpert 检测匣,检测匣内装有 PCR 反应试剂,可独立进行

PCR 处理。该试剂盒采用自成一体的封闭设计,使得样品之间的交叉污染减小到最低。GeneXpert 技术已在多个国家和地区应用,并被世界卫生组织推荐为结核分枝杆菌和利福平耐药性的检测方法^[4-5]。本研究利用 GeneXpert 法对 766 份不同类型的临床样本进行了检测,并用传统的直接涂片抗酸染色镜检法进行同步检测,比较两者对不同标本类型检测阳性率的差异性,其中 460 份标本同时进行了结核分枝杆菌培养,发现 GeneXpert 的阳性率明显高于其他方法。

1 材料和方法

1.1 材料

标本来自 2018 年 2—7 月于南京市第二医院就诊的结核及疑似结核患者 766 例,男 517 例,女 249 例,年龄 7~92 岁。其中痰标本 473 例,灌洗液 185 例,胸腹水 61 例,其他标本包括尿液、脑脊液、大便、脓液等 47 例。分别对这些标本进行直接涂片抗酸染色镜检法检测和 GeneXpert 检测,其中有 460 例标本同步进行 960 分枝杆菌快速培养,有 106 例培养阳性的样本进行了初步菌种鉴定。

GeneXpert 检测仪器及配套试剂(Cepheid 公司,美国),BACTEC™ MGIT™960分枝杆菌培养检测系统及配套试剂(BD公司,美国),分枝杆菌药敏罗氏培养基、抗酸染色液(珠海贝索生物技术有限公司),Olympus CX23显微镜(奥林巴斯公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 直接涂片抗酸染色镜检法

取标本于玻片正面均匀涂抹成10 mm×20 mm的卵圆形薄膜,自然干燥后,置于染色架上,玻片间距保持10 mm以上;加热固定(5 s内将玻片来回过火焰4次);滴加石碳酸复红溶液盖满玻片,加热至出现蒸汽后,停止加热,保持染色5 min,加热时勿使染色液沸腾。流水自玻片一端轻缓冲洗,冲去染液,沥干;滴加酸性酒精溶液盖满玻片,脱色1~2 min;如有必要,需流水冲去酸性酒精溶液后,再次脱色至无可视红色为止;流水自玻片一端轻缓冲洗10~20 s,冲去酸性酒精溶液,沥干;滴加亚基蓝溶液染30~60 s;流水自玻片一端轻缓冲洗,冲去染液,沥干,100倍油镜观察,在淡蓝色背景下,抗酸杆菌呈红色,其他细菌及细胞呈蓝色。观察结果按规程要求进行报告^[6]。

1.2.2 GeneXpert 法

痰标本:取1 mL痰标本放置到旋盖锥形管中,加入2 mL样本处理液,使用涡旋仪震荡10 s,室温静置10 min;再次使用涡旋仪震荡10 s,室温静置5 min,直至痰液充分液化,取2 mL完全液化的样本缓慢加入检测匣的加样孔中,使用GeneXpert 仪器进行检测。

灌洗液:将灌洗液(多于5 mL)转移至锥形离心管中,3 000 g离心15 min,弃上清,加入2 mL样本处理液并涡旋震荡,重悬沉淀物,充分混匀,将2 mL经过处理的样本加入试剂匣, GeneXpert 进行检测。

胸腹水:将EDTA抗凝管收集的胸腹水转移至锥形离心管中,3 000 g离心15 min,弃上清,加入2 mL样本处理液并涡旋震荡,重悬沉淀物,充分混匀,将2 mL经过处理的样本加入试剂匣, GeneXpert 进行检测。

GeneXpert 检测结果通过 GeneXpert System 测量荧光信号和内设的算法来判定,由系统直接报告结果,并在“预览结果”窗口显示。较低的 C_T 值代表了较高的DNA模板起始浓度;较高的 C_T 值代表了较低的DNA模板起始浓度。

1.2.3 960分枝杆菌快速培养

痰液、灌洗液:标本使用《大众健康真菌生物

学:实验室Ⅲ级指南》中推荐的NALC-NaOH方法进行处理。

体液:用无菌方法采集的标本,即使不经过净化处理也不会有其他细菌被接种到培养管中。若预计标本中包含其他杂菌,则标本必须经过净化处理。

粪便:挑取1 g粪便放入5 mL无菌生理盐水中制备成悬浊液,将悬浊液放在涡旋器上涡旋震荡5 s,再使用《大众健康真菌生物学:实验室Ⅲ级指南》中推荐的NALC-NaOH方法处理标本。

标本处理15~20 min后,加pH值为6.8的磷酸盐缓冲溶液将经过处理的标本混合液稀释至50 mL。以3 000 g离心15 min后弃上清,然后使用磷酸盐缓冲溶液1~3 mL复溶沉淀物制成悬液,在BBL™ MGIT™分枝杆菌7 mL培养管中加入0.5 mL悬液,并将1滴(0.1 mL)悬液加入到分枝杆菌固体培养基上。将BBL™ MGIT™分枝杆菌培养管放入BACTEC™ MGIT™960分枝杆菌培养检测仪器,培养管在仪器推荐的42 d培养周期内将被自动检测。将阳性培养管从仪器中取出,使用快速酸涂片染色法进行复核,观察涂片和培养结果。

1.2.4 分枝杆菌绝对浓度法药物敏感性试验和菌种初步鉴别试验

取培养阳性的分枝杆菌,调整至规定浓度,根据需要接种到相应型号的罗氏培养基上,37℃恒温培养28 d,如对照培养基上分枝杆菌生长良好,则根据对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸胍(TCH)2种鉴别培养基上分枝杆菌生长情况按规定报告初步鉴别试验结果。如果2种鉴别培养基上均无分枝杆菌生长报告为牛结核分枝杆菌,如果2种鉴别培养基上均有分枝杆菌生长报告为非结核分枝杆菌,如果PNB培养基上无分枝杆菌生长而TCH培养基有分枝杆菌生长报告为人型结核分枝杆菌。本文对药敏结果不做讨论。

1.3 统计学方法

采用Excel软件进行数据整理,使用SPSS25.0软件进行统计分析,计数资料采用例数和构成比或率(%)进行描述,两种检测方法比较采用配对卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 766例标本GeneXpert与涂片法检测结果比较

766例标本分别使用直接涂片抗酸染色镜检法和GeneXpert检测结核分枝杆菌,其中涂片法和

GeneXpert法均为阳性的有157例,涂片法阳性GeneXpert阴性的有27例,涂片阴性GeneXpert阳性的有150例,两种方法均为阴性的有432例(表1)。计算得出涂片法的阳性率为24.0%,GeneXpert法的阳性率为40.1%,两者比较, $\chi^2=85.47, P < 0.001$,差异具有统计学意义,提示GeneXpert法检测结核分枝杆菌的总体阳性率高于涂片法。涂片法和GeneXpert联合检测766例标本,合并阳性率为43.6%,高于两种方法单独检测结核分枝杆菌的检出率。

2.2 不同标本类型GeneXpert与涂片法检测结果比较

473例痰液的涂片阳性率为29.4%,GeneXpert阳性率39.1%, $\chi^2=24.60, P < 0.01$;185例灌洗液涂片阳性率为21.1%,GeneXpert阳性率为53.0%, $\chi^2=$

表1 766例标本GeneXpert与涂片检测结果比较

涂片法	GeneXpert		
	阳性	阴性	合计
阳性	157	27	184
阴性	150	432	582
合计	307	459	766

47.68, $P < 0.01$; 61例胸腹水涂片阳性率为3.3%, GeneXpert阳性率为19.7%, $\chi^2=8.10, P < 0.01$; 47例其他标本类型(包括尿液、脑脊液、粪便、脓液等)的涂片阳性率为8.5%, GeneXpert阳性率为25.5%, $\chi^2=6.13, P < 0.05$; 各种标本类型使用两种检测方法得出的阳性率差异均具有统计学意义(表2)。

表2 不同类型标本GeneXpert与涂片检测结果的比较

样本类别	例数	GeneXpert 阳性[n(%)]		GeneXpert 阴性[n(%)]		χ^2 值	P值
		涂片法阳性	涂片法阴性	涂片法阳性	涂片法阴性		
痰标本	473	119(25.2)	66(13.9)	20(4.2)	268(56.7)	24.60	< 0.01
灌洗液	185	32(17.3)	66(35.7)	7(3.8)	80(43.2)	47.68	< 0.01
胸腹水	61	2(3.3)	10(16.4)	0(0)	49(80.3)	8.10	< 0.01
其他	47	4(8.5)	8(17.0)	0(0)	35(74.5)	6.13	< 0.05

2.3 460例标本GeneXpert与涂片法、培养法的结果比较

460例标本同步进行3种方法检测结核分枝杆菌,涂片法的阳性率为28.5%(131/460),GeneXpert的阳性率为47.0%(216/460),培养法的阳性率为35.4%(163/460)。涂片法与GeneXpert比较, $\chi^2=55.15, P < 0.01$; GeneXpert与培养法比较, $\chi^2=21.12, P < 0.01$; 培养法与涂片法比较, $\chi^2=13.12, P < 0.01$; 3种方法之间两两比较差异均有统计学意义,且涂片法与GeneXpert之间的差异高于GeneXpert与培养法和培养法与涂片法之间的差异。

对上述培养阳性的106例样本进一步用分枝杆菌药敏罗氏培养基进行菌种初步鉴定试验,得出25例为非结核分枝杆菌,81例为结核分枝杆菌。25例非结核的GeneXpert和涂片结果分别是:GeneXpert阳性2例,阴性23例;涂片阳性15例,阴性10例。81例结核的GeneXpert和涂片结果分别是:GeneXpert阳性77例,阴性4例;涂片阳性58例,阴性23例。由此可得GeneXpert法的灵敏度和特异度分别为95.1%(77/81)、92.0%(23/25),涂片法的灵敏度和特异度分别为71.6%(58/81)、40.0%(10/25)。

3 讨论

检查结核分枝杆菌传统的实验室方法主要有抗酸染色镜检法和培养法。镜检法虽简单、价廉,但其对标本的采集和标本含菌量的浓度要求比较高,标本含菌量在5 000~10 000条/mL才可检出阳性,故其灵敏度较低,并且无法区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌。再者,人为因素会影响涂片镜检的质量,容易造成漏诊和误诊。培养法较抗酸染色镜检法灵敏度和特异度都高,是目前诊断结核病的“金标准”方法之一,但其培养过程需1~2个月,不能满足临床快速诊断的需求,并且对标本的前处理要求较高,存在一定的污染率^[7]。新版的肺结核诊断指南中将结核分枝杆菌的分子生物学阳性作为病原学阳性的诊断依据^[3],因此许多分子生物学方法如GeneXpert、等温扩增技术(LAMP)、线性探针技术(HAIN)等在结核病的诊断中得到了应用^[8]。GeneXpert用于检测结核分枝杆菌和利福平耐药具有操作简单(仅需1个步骤的准备工作)、快速(110 min就能同时报告结核分枝杆菌及利福平耐药的结果)和灵敏度高等优点^[9-10]。

GeneXpert系统可检测的样本类型有痰液、胸腹

水、肺泡灌洗液、脑脊液、胃液、手术组织、关节液、尿液、大便等。本文对766例不同标本类型分别用涂片法和GeneXpert法进行检测,检出结核分枝杆菌的阳性率GeneXpert法明显高于涂片法。对其中460例标本同步进行培养,结果显示GeneXpert法阳性率明显高于培养法,可能是因为培养法只能检测出活菌,其对样品的采集和前处理有较高的要求。分别对痰液、灌洗液、胸腹水及其他标本类型进行分析,结果发现GeneXpert法的阳性率均明显高于涂片法,差异均具有统计学意义。灌洗液、胸腹水相对于痰液, GeneXpert阳性率与涂片法阳性率的差异更大,这可能是由于本研究在对灌洗液、胸腹水进行直接涂片时未离心,而进行GeneXpert检测使用的是离心之后的标本,未离心样本中结核杆菌浓度低于离心后样本。总之,检测痰液、灌洗液、胸腹水及其他标本类型中的结核杆菌, GeneXpert法比涂片法的敏感性更高。若将GeneXpert法与涂片法联合使用,能进一步提高结核杆菌的检出率,对于结核病的快速诊断和早期防控具有重要意义。

本文对106例培养阳性的标本进行了初步的菌种鉴定,比较其GeneXpert法与涂片法结果,发现GeneXpert法对于鉴别结核与非结核分枝杆菌的准确度可达92%以上,与培养法菌种鉴定结果符合率很高。涂片阳性GeneXpert阴性的27例,其中包括20例痰标本和7例灌洗液,经分子生物学方法或培养法鉴定,其中17例痰液和5例灌洗液为非结核分枝杆菌,5例未经鉴定。因为GeneXpert系统只能检测结核分枝杆菌,而不能检测非结核分枝杆菌,这就提示临床医生涂片阳性且GeneXpert阴性的患者可能为非结核分枝杆菌感染,应及时进行非结核分枝杆菌的相关检查,以便及时调整治疗方案^[11]。同时本研究也存在一定的局限性,首先,未对所有研究标本进行结核培养,仅有106例培养阳性的标本进行了初步菌种鉴定,无法全面反映GeneXpert法的准确性;其次,本文中作为金标准的罗氏培养基初步菌种鉴定试验无法排除结核杆菌与非结核分枝杆菌混合感染的情况,因此当初步菌种鉴定结果为非结核分枝杆菌且GeneXpert法阳性时,无法判断GeneXpert法为假阳性,因此本文获得的GeneXpert法特异度指标可能存在误差。

目前GeneXpert技术在我国正处于推广阶段,

但其昂贵的经济成本成为患者和医务工作者不得不考虑的因素,也制约了该项技术的大力推广,并且GeneXpert无法区分结核分枝杆菌是否为活菌,所以还需分枝杆菌培养等方法进行联合诊断,以获得更为全面的实验室依据。

[参考文献]

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis report 2018[R]. Geneva: World Health Organization, 2018
- [2] 朱涛,郑洪,王志坚,等. 2013—2015年丹阳市农村人口肺结核队列观察[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2018, 38(1): 76-79
- [3] 周林,刘二勇. 结核病诊断标准解读[J]. 寄生虫病与感染性疾病, 2019, 17(1): 7-9
- [4] KWAK N, CHOI S M, LEE J, et al. Diagnostic accuracy and turnaround time of the Xpert MTB/RIF assay in routine clinical practice[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e77456
- [5] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Revision of automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Policy statement[R]. Geneva: World Health Organization, 2011
- [6] 肖东楼,王文杰,许绍发,等. 中国结核病防治规划痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 22-40
- [7] 张阳奕,江渊,武洁,等. 实验室检测结核分枝杆菌对吡嗪酰胺耐药性的方法学评价[J]. 检验医学, 2018, 33(4): 326-330
- [8] 中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会, 谭耀驹, 邓云峰, 等. 结核病病原学分子诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(9): 688-695
- [9] 王怡心,陈雄豪,林惠玲,等. Xpert MTB/RIF技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(3): 176-179, 192
- [10] FRIEDRICH S O, RACHOW A, SAATHOFF E, et al. Assessment of the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF assay as an early sputum biomarker of response to tuberculosis treatment[J]. Lancet Respir Med, 2013, 1(6): 462-470
- [11] 杨燕,曾谊. 非结核分枝杆菌肺病170例回顾性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(7): 1058-1062

[收稿日期] 2020-08-05

(本文编辑:蒋莉)