

·论著·

评估 GeneXpert MTB / RIF 技术在结核性脑膜炎 诊断中的价值

吴小慧, 刘为勇, 汪峰, 孙自镛

作者单位
华中科技大学同济
医学院附属同济医
院检验科
武汉 430030
基金项目
国家重大传染病专
项(2017ZX101030
05-007)
收稿日期
2017-12-20
通讯作者
孙自镛
zysun@tjh.tjmu.
edu.cn

摘要 目的:探讨 GeneXpert MTB/RIF 检测技术在结核性脑膜炎(TBM)诊断中的应用价值。**方法:**收集疑似 TBM 患者 137 例,采集患者脑脊液标本,运用抗酸染色法、培养法、GeneXpert MTB/RIF 技术进行检测。分别以临床诊断和培养法作为参考标准来评价 GeneXpert MTB/RIF 对 TBM 的诊断性能。**结果:**137 例患者中最终纳入 124 例(90.5%),临床诊断为 TBM 51 例,非 TBM 73 例。以临床诊断为标准, GeneXpert MTB/RIF、抗酸染色法、培养法在 TBM 组检测敏感度分别为 25.5%(13/51)、3.9%(2/51)、17.6%(9/51),特异性均为 100%(73/73)。GeneXpert MTB/RIF 敏感性与培养法相比无差异($P=0.336$),但显著高于抗酸染色法($P=0.002$)。若以结核杆菌培养法作为参考标准, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的敏感性为 88.9%(8/9),特异性为 100%(73/73)。13 例经 GeneXpert MTB/RIF 检测阳性患者中均未检出利福平耐药,与传统药敏结果一致。**结论:**GeneXpert MTB/RIF 技术操作简便、快速,特异性高。

关键词 结核性脑膜炎;脑脊液;GeneXpert MTB / RIF;诊断

中图分类号 R741;R741.04 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2018.07.006

Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for Diagnosis of Tuberculous Meningitis WU Xiao-hui, LIU Wei-yong, WANG Feng, SUN Zi-yong. Department of Laboratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To evaluate the diagnostic value of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculous meningitis (TBM). **Methods:** A total of 137 patients with suspected TBM were prospectively recruited. Samples of cerebrospinal fluid were collected from all patients, and tested by acid fast staining, mycobacterial culture and GeneXpert MTB/RIF. The performance of GeneXpert MTB/RIF was evaluated by two reference standards, clinical diagnosis and mycobacterial culture, respectively. **Results:** Of the 137 enrolled subjects, 124 cases (90.5%) had a final diagnosis, with 51 cases being diagnosed definitive TBM and 73 cases being diagnosed non-TBM. When clinical diagnosis was used as the reference standard, the sensitivities of GeneXpert MTB/RIF, acid fast staining, mycobacterial culture were 25.5% (13/51), 3.9% (2/51), 17.6% (9/51), respectively. The specificities of the three methods were all 100%. The sensitivity of GeneXpert MTB/RIF was comparable to that of mycobacterial culture ($P=0.336$), and was significantly higher than that of acid fast staining ($P=0.002$). When mycobacterial culture was used as the reference standard, the sensitivity of GeneXpert MTB/RIF was 88.9%, and specificity was 100%. Rifampin resistance was not found in the 13 positive results of GeneXpert MTB / RIF assay, which was consistent with traditional drug susceptibility test. **Conclusion:** GeneXpert MTB / RIF is a simple and rapid diagnostic method with high specificity for Mtb detection.

Key words tuberculous meningitis; cerebrospinal fluid; GeneXpert MTB/RIF; diagnosis

结核性脑膜炎(tuberculous meningitis, TBM)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)感染所引起的脑膜和脊膜非化脓性炎症性疾病,是最严重的肺外结核病类型,死亡率很高^[1]。据报道, TBM 患者住院死亡率达 13%~72%,而生存者中约 20%~30%会遗留严重的中枢神经系统后遗症^[2,3]。因此,早期快速准确的诊断对 TBM 治疗及预后具有重要的意义。TBM 实验室诊断的金标准是脑脊液 Mtb 的检出,但传统的脑脊液抗酸染色涂片阳性率低,培养周期

长且敏感性较低,临床早期诊断较困难^[4]。因此,寻找一种快速准确的检测 Mtb 的方法十分必要。近年来,利福平(rifampicin, RIF)耐药实时荧光定量核酸扩增技术,即 GeneXpert MTB / RIF 在结核病方面的检测显示出较高的敏感性和特异性^[5-8]。本研究对疑似 TBM 患者的脑脊液标本进行 GeneXpert MTB / RIF 检测,并与传统结核杆菌的抗酸染色法和培养法相比较,来评估 GeneXpert MTB/RIF 在 TBM 的早期诊断及 RIF 耐药中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2016年7月至2017年10月来我院就诊的疑似TBM患者137例,纳入标准:年龄>18周岁;临床表现为头痛、呕吐、发热、易激惹、颈项强直、癫痫、局部神经损害表现、意识改变、昏睡等1项或多项临床症状和体征。排除标准:HIV感染;有腰穿禁忌证;3月内接受抗结核治疗。TBM诊断标准^[9]:脑脊液结核杆菌培养阳性或抗酸染色涂片阳性;若脑脊液结核杆菌培养阴性或涂片阴性,需同时满足以下条件:①临床表现有发热、头痛、呕吐、意识障碍、脑膜刺激征或伴有局灶性神经损害;②脑脊液经细菌学、寄生虫学、真菌或肿瘤检查结果阴性;③影像学检查提示脑积水或颅底脑膜强化;④抗结核治疗有效。根据是否符合TBM诊断将患者分为TBM组和非TBM组(不符合TBM诊断标准,未进行抗结核治疗的其他确定性诊断)。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

所有受试者在药物治疗前进行腰椎穿刺,采集脑脊液进行抗酸染色、结核菌培养及GeneXpert MTB/RIF检测,培养阳性的菌株进行药敏实验。抗酸染色法:取1 mL脑脊液离心后取沉淀进行抗酸染色,操作步骤参照《结核病实验室标准化操作与网络建设》^[10]标准进行。镜检结果根据抗酸杆菌菌量分为4+、3+、2+、1+和阴性。培养法:取1 mL脑脊液加入等量4%氢氧化钠处理15 min,进行结核分枝杆菌罗氏培养,按照《分枝杆菌分离培养标准化程序及质量保证手册》^[11]进行操作。当酸性罗氏培养基上出现肉眼可见菌落时,刮取菌落用比例法进行RIF药敏试验,按照《结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化程序及质量保证手册》^[12]进行操作。培养结果根据培养基斜面生长菌落多少判为4+、3+、2+、1+和阴性。GeneXpert MTB/RIF检测:采用美国Cepheid公司Xpert MTB/RIF试剂盒,实验过程严格按照试剂说明书进行。前处理步骤根据收集到的脑脊液体积大小决定:当收集到的脑脊液体积<2 mL,用生理盐水补足至2 mL;当脑脊液体积≥2 mL,3000g离心15 min,弃上清,用2 mL试剂盒样本处理液,重悬沉淀。取上述处理后的样品2 mL加入反应盒内,置于检测模块上,仪器开始自动检测。2 h后系统报告Mtb及RIF耐药检测结果。GeneXpert MTB/RIF结果判断依照探针的循环阈值(cycle threshold, CT)来确定。当内对照探针CT值≤38即为阳性,5个探针中至少2个探针CT值≤38即为检测到Mtb,进一步根据CT值大

小对Mtb进行半定量,CT值<16为高含量,16~22为中含量,22~28为低含量,>28为极低含量^[13]。其检测RIF耐药依据Mtb特异性分子信标早期CT值和晚期CT值之差,即 Δ CT值,当 Δ CT值>3.5时提示对RIF耐药,当 Δ CT值≤3.5时提示对RIF敏感^[14]。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计数资料以率表示,采用 χ^2 检验、校正 χ^2 检验或Fisher确切概率法进行率的比较;实验方法的诊断效能评价指标包括敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及准确性。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料及脑脊液标本3种方法检测结果

137例患者中最终纳入124例,排除13例(失访2例,诊断不明确3例,3月内接受过抗结核治疗2例,肿瘤性疾病3例,脑梗死2例,HIV感染1例)。确诊为TBM 51例(TBM组),其中男30例,女21例;平均年龄(43.7±13.2)岁。非TBM患者73例(非TBM组),其中男45例,女28例;平均年龄(39.4±15.6)岁,包括化脓性脑膜炎24例,病毒性脑膜炎30例,隐球菌性脑膜炎10例,自身免疫性脑炎9例。TBM组与非TBM组的人口统计学资料比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

124例入组患者的脑脊液经抗酸染色涂片镜检,找到抗酸杆菌2例,其中2+1例,1+1例,此2例脑脊液标本罗氏培养结果均为阳性。124例脑脊液标本经罗氏培养阳性9例,菌种初步鉴定均为Mtb,比例法药敏试验结果均为RIF敏感。GeneXpert MTB/RIF在124例患者脑脊液中检测到阳性13例,其中经罗氏培养阳性8例,余5例尽管Mtb培养阴性,但最终经临床诊断为TBM。在13例GeneXpert MTB/RIF检测阳性的标本中,Mtb含量极低($CT>28$)11例,含量低($22<CT<28$)2例,且该13例均显示RIF敏感,其中8例经比例法药敏实验检测为RIF敏感。

TBM组51例患者脑脊液用抗酸染色法检测到阳性2例(3.9%),培养法检测到阳性9例(17.6%),GeneXpert MTB/RIF检测到阳性13例(25.5%)。非TBM组73例患者的脑脊液用抗酸染色法、培养法、GeneXpert MTB/RIF检测均阴性,见表1。

2.2 GeneXpert MTB/RIF、抗酸染色法、培养法对TBM的诊断效能比较

分别以临床诊断和培养法作为诊断标准来评价GeneXpert MTB/RIF对TBM的诊断性能。以临床诊

断为参考标准,抗酸染色法、培养法、GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的灵敏度分别为 3.9%、17.6%、25.5%,特异度均为 100%,GeneXpert MTB/RIF 诊断 TBM 的灵敏度明显优于抗酸染色法($\chi^2=9.457, P=0.002$),但与培养法比较差异无统计学意义($\chi^2=0.927, P=0.336$)。3 种方法诊断 TBM 的准确度分别为 60.5%、66.1%、69.4%,两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。当以培养 Mtb 阳性作为诊断参考标准, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 灵敏度为 88.9% (8/9),明显优于抗酸染色法的 22.2% (2/9)($\chi^2=5.625, P=0.018$)。与以临床诊断为标准时相比, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的灵敏度及准确度显著提高($\chi^2=10.873, P=0.001; \chi^2=27.847, P<0.001$),见表 2。

2.3 不同体积脑脊液标本对 GeneXpert MTB/RIF 检测阳性率的影响

在 51 例确诊 TBM 患者中,用于 GeneXpert MTB/RIF 检测的脑脊液标本在低体积<2 mL 的有 16 例,检测到阳性 3 例(18.8%);中体积 2~4 mL 27 例,检测到阳性 7 例(25.9%);高体积>4 mL 8 例,检测到阳性 3 例(37.5%)。尽管随着脑脊液体积增加, GeneXpert MTB/RIF 检测阳性率升高,但高、中、低体积之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

TBM 属于重症结核病,也是结核病死亡的主要原因之一。对 TBM 患者进行早期诊断,规范治疗可显著降低其致残率、致死率^[4]。然而在 TBM 疾病早期,常缺乏典型的临床症状和影像学改变,实验室诊断如涂片镜检、分枝杆菌培养敏感性低,培养周期长,导致 TBM

的早期诊断极为困难^[15]。因此,寻找高敏感性和高特异性并适合临床推广的早期 TBM 诊断方法一直是临床上亟待解决的问题。

新型分子检测技术 GeneXpert MTB/RIF 以半巢式实时荧光定量 PCR 技术为基础,以 rpoB 基因为靶基因设定引物探针,集样品收集,核酸提取,样品扩增于一体,全自动化操作,并可在 2h 内同时完成 Mtb 及 RIF 耐药检测。GeneXpert MTB/RIF 技术操作简单、快速,仅需一个标本的前处理步骤,且检测结果精确度高,目前在临床上已逐渐开展并广泛应用于肺结核及肺外结核的诊断。Chang 等^[16]对 18 篇相关文献进行 Meta 分析得出, GeneXpert MTB/RIF 检测肺结核的综合敏感性和特异性分别为 90.4%和 98.4%,检测肺外结核的敏感性和特异性分别为 80.4%和 86.1%。由于 GeneXpert MTB/RIF 检测结核病的高度敏感性和特异性,以及 TBM 的早期诊断的困难和迫切,WHO 于 2014 年推荐 GeneXpert MTB/RIF 作为 TBM 初次检测的优先方案^[17]。Nhu 等^[18]研究发现以临床诊断为金标准, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的敏感性为 59.3%,特异性为 99.5%,在前处理中加入旋涡混匀步骤,敏感性可提高 20%。Solomons 等^[19]对 1 篇回顾性和 4 篇前瞻性相关文献进行 Meta 分析显示, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的综合敏感性为 70%,特异性为 97%。

本研究共纳入 124 例疑似 TBM 成年患者,临床确诊 TBM 51 例,其中经罗氏培养阳性并确诊为 Mtb 的有 9 例,非 TBM 73 例。若以临床诊断为标准, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的敏感性为 25.5%,与培养法 17.6%相比无统计学差异($P>0.05$),但明显优于抗酸染色法 3.9%($P<0.05$),这与张瑞雪等^[20]报道的结果类似,

表1 3种方法在2组脑脊液标本中检测结果[n(%)]

组别	例数	抗酸染色法		固体培养法		GeneXpert MTB/RIF	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
TBM 组	51	2(3.9)	49(96.1)	9(17.6)	42(82.4)	13(25.5)	38(74.5)
非 TBM 组	73	0(0.0)	73(100.0)	0(0.0)	73(100.0)	0(0.0)	73(100.0)

表2 3种方法诊断TBM的效能比较(%)

检测方法	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值	准确性
以临床诊断为参考标准					
抗酸染色	3.9	100.0	100.0	59.8	60.5
固体培养	17.7	100.0	100.0	63.5	66.1
GeneXpert MTB/RIF	25.5	100.0	100.0	65.8	69.4
以培养出 Mtb 为参考标准					
抗酸染色	22.2	100.0	100.0	91.3	91.5
固体培养	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
GeneXpert MTB/RIF	88.9	100.0	100.0	98.6	98.8

但与国外研究相比,敏感度不高,其原因可能为纳入的病例数较少或纳入患者的脑脊液标本本身含菌量较低^[19]。从检测特异来看, GeneXpert MTB/RIF 具有非常好的确诊价值, 本研究中特异性为 100.0%, 13 例检测阳性患者均通过临床资料及治疗随访确诊为 TBM。若以培养法作为诊断标准, GeneXpert MTB/RIF 检测 TBM 的敏感性为 88.9%, 特异性为 100%。因培养法敏感性较低, 阴性结果无法排除 TBM。本研究 TBM 组中, 在培养阴性的 42 例标本中检测出 5 例 GeneXpert MTB/RIF 阳性, 在涂片阴性的 49 例标本中检测出 11 例阳性, 由于 GeneXpert MTB/RIF 的高度特异性, 在培养阴性及涂片阴性患者中检测出阳性具有确诊 TBM 的价值, 使其在临床 TBM 诊断中具有重要参考价值。GeneXpert MTB/RIF 除了可以检测 Mtb, 还可同时检测 RIF 耐药情况。本研究中脑脊液培养阳性 9 例, 菌种鉴定均为 Mtb, 比例法药敏实验和 GeneXpert MTB/RIF 检测均显示对 RIF 敏感, 两者结果一致。但由于本实验用来研究耐药 TBM 例数过少, 尚不能充分评价 GeneXpert MTB/RIF 对 RIF 耐药的检测效能。如上所述, 尽管 GeneXpert MTB/RIF 与培养法检测 TBM 的敏感性和特异性相似, 但 GeneXpert MTB/RIF 相比培养法检测周期短, 2 h 即可出结果, 操作简单, 样本前处理后的整个过程均在密封的反应盒中进行, 不易污染且安全度高, 因此能更好地适应临床需求。

本研究分析了 GeneXpert MTB/RIF 阳性率与脑脊液样本体积大小的关系, 发现随着脑脊液体积增加, GeneXpert MTB/RIF 阳性率也在增加, 但三者之间差异并无统计学意义 ($P>0.05$), 这与 Nhu 等^[18]报道的高体积脑脊液样本的敏感性与低体积样本的差异并无统计学意义类似。分析可能原因为 GeneXpert MTB/RIF 阳性例数较少, 导致各组之间差异不显著, 需进一步扩大样本量进行验证。

综上所述, GeneXpert MTB/RIF 技术能够快速特异检测脑脊液中结核分枝杆菌及利福平耐药, 特异性接近于 100%, 使其具有确诊 TBM 的价值, 对早期诊断 TBM 具有重要的临床意义, 值得在临床上推广使用。

参考文献

- [1] Garg RK, Sinha MK. Tuberculous meningitis in patients infected with human immunodeficiency virus[J]. *J Neurol*, 2011, 258: 3-13.
- [2] Marais S, Pepper DJ, Marais BJ, et al. HIV-associated tuberculous meningitis--diagnostic and therapeutic challenges[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010, 90: 367-374.
- [3] Joosten AA, van der Valk PD, Geelen JA, et al. Tuberculous meningitis: pitfalls in diagnosis[J]. *Acta Neurol Scand*, 2000, 102: 388-394.
- [4] Bahr NC, Marais S, Caws M, et al. GeneXpert MTB/Rif to Diagnose Tuberculous Meningitis: Perhaps the First Test but not the Last[J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62: 1133-1135.
- [5] Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, et al. Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis[J]. *Eur Respir J*, 2012, 40: 442-447.
- [6] Rachow A, Zumla A, Heinrich N, et al. Rapid and accurate detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay--a clinical validation study[J]. *PLoS One*, 2011, 6: e20458.
- [7] Hu P, Bai L, Liu F, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in county-level laboratories in Hunan province, China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127: 3744-3750.
- [8] Singh UB, Pandey P, Mehta G, et al. Genotypic, Phenotypic and Clinical Validation of GeneXpert in Extra-Pulmonary and Pulmonary Tuberculosis in India[J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0149258.
- [9] Shekhawat SD, Purohit HJ, Taori GM, et al. Evaluation of host Hsp(s) as potential biomarkers for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2016, 140: 47-51.
- [10] 赵雁林, 刘志敏. 结核病实验室标准化操作与网络建设[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 224-232.
- [11] 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.
- [12] 赵雁林, 王黎霞, 成诗明, 等. 结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化程序及质量保证手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 15-26.
- [13] 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: 1067-1082.
- [14] 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: 2495-2501.
- [15] 郭章宝, 于森, 付佩彩, 等. 新型隐球菌性脑膜炎与结核性脑膜炎患者的脑脊液比较分析[J]. *神经损伤与功能重建*, 2012, 7: 457-458.
- [16] Chang K, Lu W, Wang J, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis[J]. *J Infect*, 2012, 64: 580-588.
- [17] World Health Organization. Global tuberculosis report. 2014, WHO/HTM/TB/2014.08 [R]. Geneva, Switzerland: WHO, 2014.
- [18] Nhu NT, Heemskerk D, Thu do DA, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52: 226-233.
- [19] Solomons RS, van Elsland SL, Visser DH, et al. Commercial nucleic acid amplification tests in tuberculous meningitis--a meta-analysis[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 78: 398-403.
- [20] 张瑞雪, 龙钢, 冯国栋, 等. Xpert MTB/RIF 对结核性脑膜炎诊断的临床评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39: 442-447.

(本文编辑:王晶)