

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.011.018
文章编号: 1005-8982 (2018) 011-0093-05

Xpert MTB/RIF 联合 T-SPOT.TB 对结核性胸膜炎及其耐药性的临床研究

孙海柏, 张丽霞, 刘佳庆, 郭明日, 李玉明, 冯冉冉, 刘雅, 谢怡
(天津市海河医院, 天津 300350)

摘要: 目的 探讨利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术 (Xpert MTB/RIF)、结核感染 T 细胞斑点检测 (T-SPOT.TB) 胸腔积液对结核性胸膜炎及其耐药性的临床价值。**方法** 选取 2012 年 6 月-2016 年 10 月于天津市海河医院就诊的确诊结核性胸膜炎患者 101 例; 同期选取院内其他疾病合并胸腔积液的患者 79 例, 分别留取胸腔积液标本进行 Xpert MTB/RIF 和 T-SPOT.TB 检测, 同时完成胸腔积液 BACTEC MG1T960 液体培养以及药物敏感性等相关性检查, 分别与临床诊断和 BACTEC MG1T960 液体培养作为参考标准进行评价。**结果** 结核性胸膜炎组 Xpert MTB/RIF 和 T-SPOT.TB 的敏感性分别为 82.18% 和 88.12%, 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 特异性分别为 96.10% 和 98.73%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Xpert MTB/RIF 和 T-SPOT.TB 与 BACTEC MU1T960 液体培养的 Kappa 值分别为 0.277 和 0.668; Xpert MTB/RIF 在诊断利福平耐药率与 BACTEC MU1T960 液体培养 Kappa 值为 0.786。**结论** T-SPOT.TB 的敏感性结合 Xpert MTB/RIF 的特异性不但缩短了诊断时间而且提高了胸膜炎诊断的准确性, 减少误诊率, 为结核性胸膜炎的早期诊断提供了有利的帮助, Xpert MTB/RIF 能对利福平的耐药性做出快速的判断。

关键字: 结核性胸膜炎; 联合; 实时荧光定量核酸扩增技术; 结核感染 T 细胞斑点检测

中图分类号: R521.7

文献标识码: A

Clinical role of Xpert MTB/RIF combined with T-SPOT.TB in diagnosis of tuberculous pleurisy and evaluation of drug resistance

Hai-bai Sun, Li-xia Zhang, Jia-qing Liu, Ming-ri Guo, Yu-ming Li, Ran-ran Feng, Ya Liu, Yi Xie
(Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract: Objective To evaluate tuberculosis pleurisy diagnosis and drug resistance in pleural effusion using Xpert *Mycobacterium tuberculosis*/Rifampicin (Xpert MTB/RIF) combined with enzyme-linked immunospot assay ELISPOT (T-SPOT.TB). **Methods** In this study, 101 cases diagnosed with tuberculous pleurisy in Tianjin Haihe Hospital from June 2012 to October 2016 and 79 cases with pleural effusion due to other diseases during the same period were enrolled. Their pleural effusion samples were collected for Xpert MTB/RIF and T-SPOT.TB detection, and BACTEC MG1T960 pleural liquid culture and drug sensitivity related examination were carried out. Using the result of BACTEC MG1T960 pleural liquid culture as a reference standard, the results of Xpert MTB/RIF and T-SPOT.TB were evaluated. **Results** In the patients with tuberculous pleurisy, the sensitivity of Xpert MTB/RIF and T-SPOT.TB was 82.18% [95% CI (0.78, 0.85)] and 88.12% [95% CI (0.84, 0.91)] respectively with statistical difference ($\chi^2=5.591, P = 0.018$), the specificity was 96.10% [95% CI (0.94, 0.98)] and 98.73% [95% CI (0.97, 0.99)] without significant difference ($\chi^2=1.022, P = 0.312$). Using BACTEC MU1T960 pleural liquid culture as the

收稿日期: 2016-11-16

standard, the kappa values of Xpert MTB/RIF and T-SPOT.TB were 0.277 and 0.668 respectively. Comparing Xpert MTB/RIF with BACTEC MU1T960 liquid culture in the diagnosis of Rifampicin resistance rate, the kappa value was 0.786, which represented the two methods were in excellent agreement. **Conclusions** The sensitivity of T-SPOT.TB diagnosis combined with the specificity of Xpert MTB/RIF not only shorten the time of diagnosis but also improve the accuracy of diagnosis of tuberculous pleurisy and reduce the misdiagnosis rate, therefore they are useful for early diagnosis of tuberculous pleurisy. Furthermore Xpert MTB/RIF helps to make a quick judgement on the resistance to Rifampicin.

Keywords: tuberculous pleurisy; combination; Xpert MTB/RIF; T-SPOT.TB

结核性胸膜炎是由结核菌及其代谢物进入正处于高度过敏状态的机体胸膜腔引起的胸膜炎症, 由于治疗不及时或不规范形成慢性包裹性积液、结核性脓胸及支气管漏等并发症, 严重影响了患者的呼吸功能, 甚至可导致死亡^[1]。目前诊断方法中抗酸染色阳性率极低, 仅为 0% ~ 25%, 胸腔积液及胸膜活检标本培养阳性率低, 且培养时间耗时过长, 难以及时指导临床治疗, 诊断金标准的胸膜活检阳性率不高。选择快速准确的诊断结核性胸膜炎的方法尤为重要。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2012 年 6 月 -2016 年 10 月于天津市海河医院就诊的结核性胸膜炎患者 101 例作为结核性胸膜炎组, 其中男性 75 例, 女性 26 例; 年龄 17 ~ 83, 平均 42.3 岁。纳入标准: ①患者有相应的临床表现, 如发热、盗汗、疲乏、胸痛、刺激性干咳及结核中毒等症状; ②超声提示有不同程度的胸腔积液, 且胸部 CT 伴有或不伴有结核病灶; ③胸腔积液为渗出液, 其中淋巴细胞增多, 所占比例 50%; 腺苷酸脱氨酶 (adenylate deaminase, ADA) ≥ 40 IU/L, 抗结核抗体阳性; ④胸腔积液涂片或培养结核杆菌阳性; ⑤结核菌素纯蛋白衍生物皮试试验阳性或强阳性; ⑥胸膜活检有典型结核病变 (如结核性肉芽肿或干酪样病变); ⑦常规治疗无效, 经抗结核治疗 2 ~ 4 周好转, 最终确诊。选取同期院内其他疾病合并胸腔积液的患者 79 例作为对照组。其中, 男性 49 例, 女性 30 例; 年龄 21 ~ 78 岁, 平均 43.5 岁。患者有大叶性肺炎、慢性阻塞性肺疾病急性加重期、支气管肺癌、胸膜转移癌、恶性胸膜间皮瘤及恶性淋巴瘤等疾病, 均无肺结核及肺外结核病史。纳入标准: ①胸腔积液为渗出液, 普通细菌培

养阴性; ②胸膜病理学检查排除结核; ③无结核中毒症状; ④临床上可明确胸水为原发性疾病所致。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 两组在初诊时抽取胸水留取 70 ml 分装到 4 个 5 ml 无菌管和 1 个 50 ml 无菌容器内, 第 1 管进行细菌学鉴定, 第 2 管进行生化免疫实验, 第 3 管用于利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测 (Xpert mycobacterium tuberculosis/rifampicin, Xpert MTB/RIF), 第 4 管用于常规检测, 50 ml 无菌容器用于结核感染 T 细胞斑点检测 (detection of T cell spot in tuberculosis, T-SPOT.TB)。

1.2.2 实验方法 ①结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 检测。BACTEC MGIT960 培养及耐药性, 按照结核病诊断细菌学检验规程进行操作。② Xpert MTB/RIF 检测。取 1 ml 胸水标本加入前处理管中, 视样本性状加入 2 倍样本体积的标本处理液, 涡旋振荡 15 ~ 30 s 静置 15 min, 吸取 2 ml 处理后样本缓慢加入反应盒, 放入检测模块进行自动化检测。MTB 结果判读根据 DNA 拷贝的高低分为高、中、低、极低及未检测出 5 个等级; 利福平药敏结果分为: 耐药、未检出及敏感。③ T-SPOT.TB 检测。采用淋巴细胞分层液经密度梯度离心法分离外周血单个核细胞 (pleural effusion mononuclear cell, PEMC), 计数并分别定量至 2.5×10^6 /ml、 2.5×10^5 /ml、 2.5×10^4 /ml 及 2.5×10^3 /ml 的细胞悬液 (留取 3 例结核性胸膜炎及 3 例对照组所致胸腔积液进行小样本预试验, 从而确定大样本实验的最佳 PEMC 浓度)。然后操作步骤完全按照说明书要求进行操作。

1.2.3 仪器与试剂 PLR- 线性探针杂交酶显色法诊断试剂盒 (德国 Hain Lifescience 公司), Hotstar Taq

酶 (德国 Qiagen 公司), MGIT960 液体培养基及药敏管 (美国 BD 公司), Hain GT Blot-48 全自动杂交仪 (德国 Hain Lifescience 公司), PCR 仪 (德国 Hain Lifescience 公司), Eppen-dorf 5804R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), 生物安全柜 (青岛海尔公司), 结核感染 T 细胞检测试剂盒 (上海复星公司), GeneXpert MTB/RIF 检测系统 (美国 Cepheid 公司)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 t 检验, 计数资料以率表示, 用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者葡萄糖、腺苷酸脱氨酶 (adenylate deaminase, ADA)、抗结核抗体 (anti tuberculosis antibody, TB-Ab) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 两组患者男女比例、年龄、唾液酸 (sialic acid, SA)、血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE)、 α -羟丁酸脱氢酶 (alpha-hydroxybutyric dehydrogenase, HBDH) 及白细胞比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 结核性胸膜炎组患者 Xpert MTB/RIF 和 T-SPOT.TB 检测结果分析

Xpert MTB/RIF 和 T-SPOT.TB 诊断结核性胸膜

炎的敏感性分别为 82.18% (95%CI: 0.78, 0.85) 和 88.12% (95%CI: 0.84, 0.91), 两组比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=5.591, P=0.018$), 特异性分别为 96.10% (95%CI: 0.94, 0.98) 和 98.73% (95%CI: 0.97, 0.99), 两组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 3 种检测方法对断结核性胸膜炎的结果分析

以 MGIT 960 液体培养为标准, Xpert MTB/RIF 的阳性率为 79.57%, 两种方法的 Kappa 值为 0.277, 一致性较低。以 MGIT960 检测为标准, T-SPOT.TB 检测的阳性率为 94.62%, 两种方法的 Kappa 值为 0.668, 一致性较高。

2.4 2 种检测方法药敏检测结果分析

101 例结核性胸膜炎的胸腔积液标本以药物敏感试验检测结果为金标准, 采用 Xpert MTB/RIF 检测 101 例菌株的利福平耐药性。其中 25 例未检测出来, 2 例为阴性, 76 例标本分别采用 BACTEC MU1T960 及 Xpert MTB/RIF 进行检测, 其中 70 例均耐药, 4 例均敏感, 两种方法的 kappa 值为 0.786, 具有极好的一致性。

2.5 耐药基因突变位点分析及构成比

对利福平耐药阳性的 6 份标本进行基因突变位点分析。见表 2。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	男/女/例	年龄/(岁, $\bar{x} \pm s$)	葡萄糖 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)	SA (mg/L, $\bar{x} \pm s$)	ACE (u/L, $\bar{x} \pm s$)
结核性胸膜炎组 ($n=101$)	75/26	42.3 \pm 18	5.61 \pm 2.75	485.4 \pm 182.36	19.46 \pm 15.37
对照组 ($n=79$)	49/30	43.5 \pm 19	3.41 \pm 2.25	490.53 \pm 213.06	22.07 \pm 24.42
t/χ^2 值	3.095	0.433	5.759	0.174	0.875
P 值	0.079	0.665	0.000	0.862	0.383

组别	白细胞 ($10^9/L, \bar{x} \pm s$)	HBDH (g/L, $\bar{x} \pm s$)	ADA (u/L, $\bar{x} \pm s$)	TB-Ab 阳性率/%
结核性胸膜炎组 ($n=101$)	1861 \pm 1048	41.24 \pm 10.11	29.13 \pm 8.15	65.347
对照组 ($n=79$)	1580 \pm 1118.27	42.47 \pm 16.28	18.41 \pm 6.58	34.177
t/χ^2 值	1.733	0.621	9.513	17.245
P 值	0.084	0.535	0.000	0.000

表 2 耐药基因突变位点分析及构成比

缺失及突变探针	突变位点分析	株数	构成比 /%
rpoB 基因	-	6	-
W T8 缺失— MUT3 出现	530~533 位点 (S531L 为主)	5	83.33
W T3/WT4 缺失— MUT1 出现	513~519 位点 (D516V 为主)	0	0.00
W T7 缺失— MUT2B	526~529 位点 (H526Y)	0	0.00
W T7 缺失— W T8 缺失	526~533 位点	1	16.67
W T7 缺失— MUT2 A 出现	526~529 位点 (H526Y)	0	0.00
W T7 缺失— MUT1 出现	526~529 位点, 513~519 位点 (D516V 为主)	0	0.00
W T8 缺失— MUT2B 出现	530~533 位点, 526~529 位点 (H526D 为主)	0	0.00
W T8 缺失— rpoB MUT3 出现	530~533 位点 (S531L 为主)	0	0.00
合计	-	6	100.00

3 结论

T-SPOT.TB 是近年来发展起来的一项快速诊断结核病的新技术,其原理是指当人体 T 细胞受到结核菌抗原的再次刺激后,活化的效应 T 细胞,产生抗结核感染免疫中的关键性细胞因子干扰素- γ ^[2]。此技术已经很成熟的应用于临床实验室检测,具有较高的敏感度和特异性,且与卡介苗不存在交叉反应的优势引起临床越来越多的重视^[3]。对于患者全血的研究较多,但对于胸腔积液干扰素的释放研究较少,本文收集患者的胸腔积液提取单个核细胞进行检测,以提高诊断的准确率,诊断结核性胸膜炎的灵敏性和特异性为 96.10% 和 98.73%,均较高。LEE 等^[4]对欧洲及我国台湾地区的胸腔积液进行了小样本研究,结果发现胸水及外周血的 T-SPOT.TB 检测诊断结核性胸膜炎均有较好的敏感性、特异性,还有报道结核性胸膜炎有较高的阳性率达 91.67%,报告结论与本文的实验结果相接近,并且在一些研究中也证实了 T-SPOT.TB 检测在肺外不同部位结核中的诊断价值^[5]。有文献报道 T-SPOT.TB 检测联合 ADA 检测也可提高检测的准确率^[6]。Xpert MTB/RIF 是检测结核分枝杆菌及其对利福平耐药性的快速分子诊断方法,目前肺外结核运用较多,但是对胸腔积液的诊断中以金标准为标准其敏感性较低,当胸水中结核分枝杆菌太少或标本中含 Taqman 抑制物及分枝杆菌 DNA 提取效率低时,都有可能出现假阴性^[7]。一些文献中报道结核性胸膜炎 Xpert MTB/RIF 敏感性和特异性分别为 28.7% 和 96.6%,而相应的阳性和阴性预测值分别

为 96.1% 和 31.1%^[8]。此外,近来应用 Xpert MTB/RIF 检测胸膜组织样本发现, Xpert MTB/RIF 未能检测出任何已确诊的结核患者^[9]。结合本文所做测试结果, Xpert MTB/RIF 对胸腔积液灵敏度较低(15%~44%),准确度有限。胸腔积液 Xpert MTB/RIF 试验不能准确诊断胸膜结核,不推荐用作疑似胸膜结核患者的初始评价试验^[10]。还有些报道认为 Xpert MTB/RIF 在非呼吸道标本中诊断结核病的敏感度不一致,但特异性均较高^[11-12]。

Xpert MTB/RIF 系统是用于检测结核病的分子诊断平台,由于大多数利福平耐药菌株都对异烟肼耐药,因此利福平耐药情况在一定程度上能作为耐药结核病的检测指标^[13]。其以通过 rpoB 基因 RIF 的耐药决定区的 81 bp 核心区为靶序列,能够在 2 h 内检测 MTB 和利福平的耐药性^[14]。Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药性与 MGIT960 不一致的情况,可能是由于 rpoB 区内其他突变所致或者由于其他基因突变导致,理论上标本中含有 ≥ 1 种的 MTB 混合培养或污染时,若其中一种有突变探针未涵盖的突变,将出现野生型带型^[15]。本次实验对 Xpert MTB/RIF 与金标准对胸水的检测进行比较,结果一致性较好,但是标本量较少,有待于进一步研究,同时也值得临床进一步推广。

综上所述, T-SPOT.TB 对结核性胸水诊断的敏感性及其特异性,同时结合 Xpert MTB/RIF 的特异性能对结核性胸膜炎作出快速诊断和排除。Xpert MTB/RIF 可直接检测 MTB 的核酸并可检出其对利福平的耐药性,使病人得到快速诊治。

参 考 文 献:

- [1] 杨斌, 结核性胸膜炎治疗新进展 [J]. 中国医药导报, 2012, 1, 9(3): 8-10.
- [2] CHIAPPINI E, DELLA BELLA C, BONSIGNORI F, et al. Potential role of M.tuberculosis specific IFN-gamma and IL-2 ELISPOT assays in Discriminating children with active or Latent Tuberculosis[J]. PLOS One, 2012, 7(9): DOI: 10.1371/journal.pone.0046041.
- [3] 叶秋月, 许文兵. T-SPOT. TB 在肺结节病与肺结核鉴别诊断中的应用价值 [J]. 基础医学与临床, 2014, 34(4): 527-530.
- [4] LEE L N, CHOU C H, WANG J Y, et al. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. Clin Microbial Infect, 2009, 15(2): 173-179.
- [5] 高卫红, 高国生, 高国生. 结核感染 T 细胞斑点试验在宁波地区结核病诊断中的价值初探 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(3): 447-449.
- [6] 钟一鸣, 谷秀梅, 刘文恩. T 细胞斑点试验辅助诊断不同部位肺外结核感染的应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(17): 4415-4417.
- [7] 吴瑕, 仇海兵. 结核感染 T 细胞斑点试验和腺苷脱氨酶在结核性胸膜炎诊断中的临床应用价值 [J]. 吉林医学, 2017, 38(2): 260-262.
- [8] LUSIBA J K, NAKIYINGI L, KIRCNGA B J, et al. Evaluation of Cepheid's Xpert MTB/Rif test on pleural fluid in the diagnosis of pleural tuberculosis in a high prevalence HIV/TB setting[J]. Plos One, 2014, 9(7): DOI: 10.1371/journal.pone.0102702.
- [9] CHRISTOPHER D J, SCHUMACHER S G, MICHAEL J S, et al. Performance of Xpert MTB/RIF on pleural tissue for the diagnosis of pleural tuberculosis[J]. Eur Respir J, 2013, 42(5): 1427-1429.
- [10] 吴春明. 结核性胸膜炎实验室诊断进展 [J]. 现代医药卫生, 2016, 5, 32(10): 1499-1501.
- [11] CAUSSE M, RUIZ P, GUTIERREZ-AROCA J B, et al. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extra pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 29(8): 3065-3067.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] BOEHME C C, NABETA P, HILLEMANN D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [15] 郭明日, 王冰冰. PCR 一线性探针杂交酶显色法在结核病诊断与耐药性检测中的应用研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(7): 1483-1485.

(李科 编辑)