

· 论 著 ·

TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 及罗氏固体培养 在肺结核诊断中的比较

刘权贤, 王鸿, 陈玲, 李瑜琴, 袁阳, 张建勇

遵义医学院附属医院呼吸二科, 贵州 遵义 563000

摘要: **目的** 比较结核分枝杆菌环介导核酸等温扩增技术(TB-LAMP)、利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术(Xpert MTB/RIF)及罗氏固体培养三种检测技术对活动性肺结核诊断的应用价值。**方法** 收集活动性肺结核患者痰标本 152 份(涂阳标本 80 份,涂阴标本 72 份),分别行 TB-LAMP 法、Xpert MTB/RIF 和罗氏固体培养检测结核分枝杆菌。**结果** 在涂阳痰标本 80 例中,MTB 阳性率 LAMP 检测为 98.8%,Xpert MTB/RIF 检测为 95.0%,罗氏固体培养为 85.0%;三种检测方法阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在涂阴痰标本 72 例中,MTB 阳性检出率 LAMP 检测为 31.9%,Xpert MTB/RIF 检测为 25.0%,罗氏固体培养为 16.7%,三种检测方法阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),LAMP 技术 MTB 阳性检出率最高,Xpert MTB/RIF 检测次之,罗氏培养的检出率最低。**结论** 对涂阳肺结核痰标本,TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 与罗氏培养在 MTB 的检出上具有同等效能;对涂阴肺结核痰标本,TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 检测优于罗氏培养,相对于 Xpert MTB/RIF,TB-LAMP 因简便、快速、价廉,更适用于发展中国家或地区对肺结核病的诊断及防控。

关键词: 结核分枝杆菌环介导核酸等温扩增技术;利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术;结核菌培养;诊断;肺结核

中图分类号: R 521 R 446.5 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2018)12-1611-03

Comparison of TB-LAMP, Xpert MTB/RIF and Roche solid culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis

LIU Quan-xian, WANG Hong, CHEN Ling, LI Yu-qin, YUAN Yang, ZHANG Jian-yong

Second Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China

Corresponding author: CHEN Ling, E-mail: lingjuncd@163.com

Abstract: Objective To compare the application value of loop-mediated isothermal amplification for tuberculosis (TB-LAMP), Xpert Mycobacterium tuberculosis (MTB)/rifampicin (RIF) assay, and Roche solid culture in diagnosis of active pulmonary tuberculosis. **Methods** A total of 152 sputum specimens were collected from the patients with active pulmonary tuberculosis (80 smear-positive specimens and 72 smear-negative specimens). MTB was respectively detected by TB-LAMP, Xpert MTB/RIF and Roche solid culture. **Results** In 80 smear-positive sputum samples, the positive rates of MTB detected by TB-LAMP, Xpert MTB/RIF and Roche solid culture were 98.8%, 95.0% and 85.0% respectively. There was no significant difference in the positive rate by three methods ($P > 0.05$). In 72 smear-negative sputum specimens, the positive rates of MTB detected by TB-LAMP, Xpert MTB/RIF and Roche solid culture were 31.9%, 25.0% and 16.7% respectively. There was significant difference in the positive detection rates among the three methods ($P < 0.05$). The positive rate detected by LAMP was the highest, followed by Xpert MTB/RIF, and the lowest by Roche culture. **Conclusion** TB-LAMP, Xpert MTB/RIF and Roche culture have the same effect in detecting MTB for smear-positive pulmonary tuberculosis sputum specimens. TB-LAMP and Xpert MTB/RIF are better than Roche culture for smear-negative tuberculosis sputum specimens. Compared with Xpert MTB/RIF, TB-LAMP is more suitable for diagnosis, prevention and control of pulmonary tuberculosis in developing countries or regions because of its simplicity, rapidity and low cost.

Key words: Loop mediated isothermal amplification for tuberculosis; Xpert Mycobacterium tuberculosis/rifampicin; Tubercle bacillus culture; Diagnosis; Pulmonary tuberculosis

肺结核是由结核分枝杆菌(MTB)引起的肺部严重呼吸道传染病,是世界上三大传染病之一^[1]。据世界卫生组织统计数据,2016年,全球范围内估计有1 040万结核病例,有170万人死于结核病;在中国,结核病发病率为64/10万,死亡率是38/10万^[2]。尽管结核病较20世纪90年代下降了约50%,但结核病仍是世界上人群健康最大的威胁^[3]。早期快速准确诊断及治疗是控制结核病传播的关键^[4]。目前,肺结核的诊断主要依靠患者症状、胸部影像学检查及痰涂片抗酸染色和痰MTB培养。然而,肺结核患者症状及影像学检查往往缺乏特异性,痰涂片抗酸染色法检查敏感性及特异性均低,易致漏诊;痰MTB培养耗时长,以上检测手段难以满足早期快速准确诊断肺结核的要求。近年来,世界卫生组织先后推荐利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术(Xpert MTB/RIF)、MTB环介导核酸等温扩增技术(TB-LAMP)^[5]作为快速分子诊断技术用于临床,关于二者的临床应用价值,国内鲜有报道。本研究对活动性肺结核的患者痰标本分别采用TB-LAMP技术、Xpert MTB/RIF和罗氏固体培养三种检测方法进行检测,评价三种检测技术在活动性肺结核诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院2016年12月至2017年12月门诊及住院临床诊断肺结核的涂片阳性患者痰标本80份,涂片阴性患者痰标本72份,每人送检一份合格痰标本,共计152份。其中男性98例,女性54例;年龄15~86岁,平均48.2岁。肺结核具体诊断标准参照《中华人民共和国卫生行业标准肺结核诊断标准(WS288-2008)》。经医院伦理委员会同意,所有患者均同意收集其痰标本用于本次临床研究并签署知情同意书。课题组成员已接受TB-LAMP操作专业培训,并于2015年获由中国疾病预防控制中心颁发的Xpert MTB/RIF检测能力验证证书。

1.2 仪器与试剂 PURE-LAMP前处理(货号VMP802,日本荣研株式会社)、TB-LAMP扩增试剂盒(货号VMP521,日本荣研株式会社)、Loopamp®恒温荧光核酸扩增仪(型号LF-160,日本荣研株式会社)。Xpert MTB/RIF检测仪(美国Cepheid公司)、Xpert MTB/RIF试剂盒[Cepheid AB,批号:1000061494,注册证号:国食药监械(进)字2014第3401153号]。

1.3 TB-LAMP检测 按TB-LAMP扩增试剂盒说明书分别进行MTB DNA提取、扩增和结果判读。同时做14个痰液样本TB-LAMP检测耗时约1 h。

1.4 Xpert MTB/RIF检测 将行TB-LAMP检测余

下的痰标本与样品消化液以1:2比例加入15 ml无菌干燥离心管中,震荡,室温静置15 min,使痰标本充分液化。使用与Xpert MTB/RIF样品盒配套的一次性移液管将2 ml处理后的样品加至Xpert样品盒中,将Xpert MTB/RIF样品盒扫描二维码,录入信息,放入Xpert MTB/RIF仪器中,2 h后读取检测结果。

1.5 罗氏固体培养 取4倍体积的4% NaOH溶于行TB-LAMP检测、Xpert MTB/RIF检测余下的痰标本中,间隙振动摇匀15 min,使痰标本充分液化,用一次性无菌吸管分别取处理后的痰标本2~3滴,均匀分布于2管酸性培养基斜面上,然后将接种标本的培养基放入37℃培养箱中,于接种后每周观察、记录培养结果,共观察8周。

1.6 统计学方法 TB-LAMP与Xpert MTB/RIF、罗氏固体培养三者阳性检出率的比较,应用GraphPad Prism 6软件,计数资料采用 χ^2 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰涂阳标本中三种方法MTB检出结果比较 涂阳标本80例,LAMP检测阳性79例,Xpert MTB/RIF检测阳性76例,罗氏培养阳性68例。LAMP检测阳性而Xpert MTB/RIF检测阴性4例,LAMP检测阴性而Xpert MTB/RIF检测阳性1例;LAMP检测阳性而罗氏培养阴性12例,LAMP检测阴性而罗氏培养阳性1例;Xpert MTB/RIF检测阳性而罗氏培养阴性11例,Xpert MTB/RIF检测阴性而罗氏培养阳性3例。在涂阳痰标本80例中,LAMP检测MTB阳性率为98.8%,Xpert MTB/RIF检测MTB阳性率为95.0%,罗氏固体培养MTB阳性率为85.0%。三种检测方法阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 痰涂阴标本中三种方法MTB检出结果比较 涂阴标本72例,LAMP检测阳性23例,Xpert MTB/RIF检测阳性18例,罗氏培养阳性12例。LAMP检测阳性而Xpert MTB/RIF检测阴性5例,LAMP检测阴性而Xpert MTB/RIF检测阳性0例;LAMP检测阳性而罗氏培养阴性13例,LAMP检测阴性而罗氏培养阳性2例;Xpert MTB/RIF检测阳性而罗氏培养阴性6例,Xpert MTB/RIF检测阴性而罗氏培养阳性0例。在涂阴痰标本72例中,LAMP检测MTB阳性检出率为31.9%,Xpert MTB/RIF检测MTB阳性检出率为25.0%,罗氏固体培养MTB阳性检出率为16.7%。三组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。MTB阳性检出率LAMP技术最高,Xpert MTB/RIF次之,罗氏培养最低。

3 讨论

近年来,基于结核菌基因检测的分子诊断技术得到了较快发展,代表性的检测技术有 Xpert MTB/RIF 及 TB-LAMP 技术。Xpert MTB/RIF 是由美国 Cepheid 公司研发的基于核酸扩增的一种半巢式荧光定量 PCR 体外分子诊断技术,同时针对利福平常见耐药突变基因(*rpoB* 基因) 81bp 耐药核心区间(RRDR)设计引物、探针,检测其是否发生突变,进而用于辅助诊断是否为结核以及是否对利福平耐药^[6-7]。对于痰标本 MTB 的检测具有较高的敏感性 & 特异性^[8]。TB-LAMP 是由日本荣研化学株式会社开发的一种简便、快速、价廉、敏感性 & 特异性高的基因扩增技术^[9],其原理主要是对 MTB DNA 上的 6 个区段设计 4 个不同的引物,利用链置换反应,对目标 DNA 进行大量扩增,整个检测过程耗时约 60 min^[10]。由于在反应液中加入钙黄绿素荧光染料,如为阳性反应,在 LED 灯或日光下通过肉眼观察为绿色;反之,则保持钙黄绿素的橙色不变^[11]。本研究结果显示,对涂阳肺结核的患者痰标本, TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 检测在 MTB 的检出上与罗氏固体培养具有相当的效能,这与张伟阳^[12]、Yan^[13] 等学者的研究结果一致;对于涂阴肺结核的患者痰标本, TB-LAMP 技术优于 Xpert MTB/RIF 检测及罗氏培养,其相对于 Xpert MTB/RIF,由于不需要昂贵、精密的仪器、检测试剂成本低,更适用于发展中国家或地区对肺结核病的诊断及防控。

本研究中, TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 与罗氏培养结果不完全一致。原因分析:(1) TB-LAMP 及 Xpert MTB/RIF 阳性而罗氏培养阴性,考虑可能系 TB-LAMP 及 Xpert MTB/RIF 不能区分 MTB 活力有关,而罗氏固体培养阳性的前提是标本中必须有活的 MTB 存在,或者与罗氏固体培养阳性所需 MTB 数目较多有关,罗氏固体培养阳性标本中需要的 MTB 菌数需 1×10^2 /ml,而 TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 法只需要标本中有极微量的抗酸杆菌就能检测,上述因素也可能是 TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 检测 MTB 阳性检出率高于罗氏培养的原因。此外, TB-LAMP 及 Xpert MTB/RIF 检测出现假阳性也可导致罗氏培养出现阴性。(2) 罗氏培养阳性而 TB-LAMP 及 Xpert Mtb/RIF 阴性,原因可能与 TB-LAMP 及 Xpert MTB/RIF 检测时未采集到含有 MTB 的痰标本,或取样量少导致被

取标本中所含 MTB 数量低于检测限,也可能是标本中细菌为非 MTB。

综上所述,涂阳痰标本, TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 与罗氏培养对 MTB 的检出率具有相当的效能;涂阴痰标本, TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 检测优于罗氏培养,相对 Xpert MTB/RIF, TB-LAMP 因简便、快速、准确、价廉,更适用于发展中国家或地区对肺结核病的诊断及防控。

参考文献

- [1] 郝志红. 乡村两级肺结核防治规范化管理的实践效果分析[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(13): 6-7.
- [2] WHO. Global Tuberculosis Report 2017[R]. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [3] Ortizmartínez Y. Assessing worldwide research productivity on tuberculosis over a 40-year period: A bibliometric analysis[J]. Indian J Tuberc, 2017, 64(3): 235-236.
- [4] 孟伟民. 结核病实验诊断的研究现状[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(38): 42-43.
- [5] WHO. The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: Policy Guidance[M]. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [6] 王霄, 文强, 岳健博, 等. GeneXpert Mtb/RIF、抗酸染色及培养在浅表淋巴结核诊断中的比较研究[J]. 遵义医学院学报, 2016, 39(3): 275-278.
- [7] 刘旭晖, 张爱梅, 卢水华. Xpert MTB/RIF 试验用于肺结核快速检测的临床研究[J]. 中华肺部疾病杂志: 电子版, 2016, 9(5): 524-527.
- [8] Tang T, Liu F, Lu X, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for detecting Mycobacterium tuberculosis in a hospital in China. [J]. J Int Med Res, 2017, 45(2): 816-822.
- [9] Zhang H, Wang Z, Cao X, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *mpb70* gene for rapid differential detection of Mycobacterium bovis[J]. Arch Microbiol, 2016, 198(9): 905.
- [10] Gelaw B, Shiferaw Y, Alemayehu M, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification assay and smear microscopy with culture for the diagnostic accuracy of tuberculosis[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 79.
- [11] 刘威, 李奉京, 黄留玉, 等. 基于颜色判定的 LAMP 方法快速检测结核分枝杆菌[J]. 中国医疗器械信息, 2014, 20(10): 7-10.
- [12] 张伟阳, 钟建平, 杨国彪, 等. LAMP 和 Xpert MTB/RIF 早期诊断肺结核传染源的价值比较[J]. 温州医科大学学报, 2017, 47(1): 61-63.
- [13] Yan L, Xiao H, Zhang Q. Systematic review: Comparison of Xpert MTB/RIF, LAMP and SAT methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2016, 96: 75-86.

收稿日期: 2018-05-04 修回日期: 2018-06-03 编辑: 王国品