

论著·临床研究

应用一致性检验对泌尿系结核 3 种检测方法的评估^{*}

张昭勇, 杨宏伟, 张吉才[△]

(十堰市太和医院/湖北医药学院附属医院检验部, 湖北十堰 442000)

摘要:目的 评价结核分枝杆菌 *rpoB* 基因和突变检测技术(Xpert MTB/RIF)、结核杆菌固体培养与抗酸染色镜检对泌尿系结核的诊断效能及其一致性。方法 采用随机双盲、“金标准”对照的临床诊断实验设计, 收集临床泌尿系结核可疑患者 163 例的晨尿, 分别应用 Xpert MTB/RIF、结核杆菌固体培养与抗酸染色镜检进行检测。以临床综合诊断作为泌尿系结核诊断的“金标准”, 评价 3 种检测方法的诊断效能并比较其检测结果的一致性。结果 163 例患者尿标本使用 Xpert MTB/RIF 检出结核阳性 51 例(31.29%), 结核杆菌固体培养法检出结核阳性 40 例(24.54%), 抗酸染色镜检检出结核阳性 39 例(23.93%)。与“金标准”临床诊断泌尿系结核诊断比较, Xpert MTB/RIF 检测和结核杆菌固体培养具有极高的一致性, 抗酸染色镜检的一致性较弱。结论 3 种实验室检测方法均适用于临床泌尿系结核的诊断, 其中结核杆菌固体培养法与临床综合诊断法具有更高的一致性。Xpert MTB/RIF 不仅具有高度的一致性而且具有更高的灵敏度, 适用于泌尿系结核的快速诊断。

关键词:泌尿系结核; 结核分枝杆菌 *rpoB* 基因和突变检测技术; 一致性检验; 诊断效能

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.014

中图法分类号:R527, R446.5

文章编号:1673-4130(2019)22-2745-04

文献标识码:A

Evaluation of three detection methods for urinary tuberculosis by consistency test^{*}

ZHANG Zhaoyong, YANG Hongwei, ZHANG Jicai[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shiyan Taihe Hospital/Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To evaluate the diagnostic efficacy and consistency of *rpoB* gene and mutation detection technology (Xpert MTB/RIF), solid culture of *Mycobacterium tuberculosis* and acid-fast staining microscopy in urinary tuberculosis. **Methods** A randomized, double-blind, gold standard-controlled clinical diagnostic experimental method was designed. Totally 163 cases of suspected urinary tuberculosis patient urine were collected in the morning, Xpert MTB/RIF, solid culture of *Mycobacterium tuberculosis* and acid-fast staining microscopy were used for detection. Clinical diagnosis was used as gold standard of urinary tuberculosis diagnosis, to evaluate the consistency and diagnosis efficiency of other methods. **Results** In 163 patients urine, 51 cases (31.29%) were positive detected by Xpert MTB/RIF, 40 cases (24.54%) were positive by solid culture and 39 cases (23.93%) by acid-fast staining microscopy. Compared with the “gold standard” clinical diagnosis of urinary tuberculosis, Xpert MTB/RIF test and *Mycobacterium tuberculosis* solid culture had a very high consistency, but the acid-fast staining microscopy had a very weak consistency. **Conclusion** All the three laboratory tests are suitable for clinical diagnosis of urinary tuberculosis, and the solid culture method of tuberculosis bacillus is more consistent with the comprehensive clinical diagnosis method. Xpert MTB/RIF not only has high consistency but also has higher sensitivity. It is suitable for rapid diagnosis of urinary tuberculosis.

Key words: urinary tuberculosis; *mycobacterium tuberculosis rpoB* gene and mutation detection technology; consistency test; diagnostic efficacy

结核是由结核分枝杆菌引起的一种传染病, 目前仍然是全球最关注的公共卫生问题。2018 年 WHO 发布的报告显示, 在世界范围内, 结核病是十大死因

之一, 也是传染病中全球第一大死因, 且大多数病例发生在亚洲和非洲。2017 年, 结核病共造成了约 130 万艾滋病毒阴性人群和 30 万艾滋病毒阳性人群死

^{*} 基金项目: 湖北省卫生厅优秀青年人才项目(WJ2015Q039); 2018 年度十堰市太和医院院级基金项目(2018JJXM037)。

作者简介: 张昭勇, 男, 副主任技师, 主要从事细菌的耐药性研究。 [△] 通信作者, E-mail: jicaizhang@hotmail.com。

本文引用格式: 张昭勇, 杨宏伟, 张吉才. 应用一致性检验对泌尿系结核 3 种检测方法的评估[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2745-

亡^[1]。在 2017 年新诊断的 640 万例结核病中肺外结核(EPTB)新发或复发占 14%。一系列数据显示 EPTB 在很多地方都有增加的趋势,但是公共卫生部门并未给予高度重视,这主要是因为 EPTB 与结核的传播并不显著相关。然而,EPTB 在结核病的病死率、严重并发症和致残率较高,是迫切需要解决的问题^[2-3]。

泌尿系结核是 EPTB 较为常见的一个类型,也是临床上一种严重的 EPTB,临床上 5%~20% 的肺结核伴有泌尿系结核^[4-5]。泌尿系结核极易误诊,原因在于其症状类似于普通的细菌感染且缺乏快速灵敏的实验室诊断方法,导致患者延误治疗而预后不良。目前,实验室诊断泌尿系结核的方法主要包括抗酸染色和分枝杆菌培养。抗酸染色既便宜又快速,但缺乏灵敏度和重复性。结核的固体和液体培养虽然具有较高的灵敏度和特异度,但是耗时、耗力,不能满足快速的临床要求^[6-7]。随着分子生物学技术的突飞猛进,耐药结核病相关耐药基因快速诊断技术的使用日益广泛。结核分枝杆菌 *rpob* 基因和突变检测技术(Xpert MTB/RIF)系统就是一种全新的快速检测结核分枝杆菌和其耐药性的系统,该系统针对结核分枝杆菌的 81 bp 利福平耐药核心区间(RRDR)设定引物、探针并进行扩增检测,根据其是否发生基因突变来检测样本中是否含有结核分枝杆菌及其是否对利福平耐药。该系统是一种全自动一体化半定量巢式实时 PCR 系统,可以在 2 h 内快速对样本进行核酸提取、纯化及浓缩检测,有报道称其在肺结核诊断的灵敏度和特异度可高达 77.2% 和 98.8%^[8]。但是, GeneXpert 尿样本检测诊断泌尿系结核的数据有限,其诊断效率需要进一步评估。为对上述泌尿系结核诊断的实验室方法进行合理评估,笔者对临床收集的 163 例疑似泌尿系结核的住院患者尿标本同时进行盲法检测,以临床综合诊断作为泌尿系结核诊断的“金标准”,对抗酸染色镜检法、结核杆菌固体培养和 Xpert MTB/RIF 检测法进行诊断性能评价,分析它们的诊断价值并比较其一致性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 3 月至 2018 年 6 月本院住院疑似泌尿系结核患者 163 例,其中男 89 例,女 74 例;年龄 29~83 岁,平均(57.89±12.98)岁。

1.2 仪器与试剂 美国赛沛 GeneXpert Dx System 及 Xpert MTB/RIF 试剂盒,光学显微镜(日本 Olympus)、抗酸染液(珠海贝索生物技术有限公司)、载玻片、香柏油、CO₂ 孵育箱、罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 尿标本 Xpert MTB/RIF 检测 患者无菌留取晨尿 40 mL,实验操作严格按照 Xpert MTB/RIF

试剂盒说明书进行,即取 2 mL 尿标本加入 4 mL 样本处理液,震荡混匀后室温孵育 15 min,取 2 mL 上清液加入检测试剂盒并加载到 GeneXpert Dx System。仪器在大约 2 h 内自动完成对结核分枝杆菌和 RIF 耐药基因的检测。

1.3.2 结核分枝杆菌固体培养 取 20 mL 尿标本,经 3 000×g 离心 20 min,取沉渣加等量 4% NaOH 消化液,处理 15~20 min 后用 PBS 缓冲液中和(pH=7.4),取 0.1 mL 接种罗氏固体培养基,CO₂ 孵育箱 35 ℃,8 周末见菌落生长者可报告阴性。

1.3.3 抗酸染色 取 10 mL 尿标本,经 3 000×g 离心 20 min,取沉渣涂片干燥抗酸染色,操作步骤按照抗酸染液(珠海贝索生物技术有限公司)说明书进行。镜检连续观察 300 个油镜视野,结果按照全国临床检验操作规程报告。

1.3.4 泌尿系结核临床诊断 “金标准”包括患者临床症状、实验室检查及放射影像学特征。无阳性培养证据的可疑患者抗结核治疗有效是确诊泌尿系结核的唯一指标^[9]。

1.4 统计学处理 使用 SPSS18.0 软件进行数据处理,计数资料以率表示,率的比较采用 χ^2 检验。Kappa 一致性检验评价不同检测方法的一致性,当 Kappa 值<0.00,一致性强度极差;0.00~0.20,微弱;0.21~0.40,弱;0.41~0.60,中度;0.61~0.80,高度;0.81~1.00,极强。Kappa 值的假设检验, $\mu>1.96$, $P<0.05$ 可认为 2 种测定方法结果具有一致性^[10]。样本含量的估算:估计该试验灵敏度为 85%,特异度为 80%,设允许误差 $\Delta=0.10$, $\alpha=0.05$, $Z_{\alpha}=1.96$ (双侧)。则病例组样本量= $1.962 \times 0.90 \times (1-0.90)/0.102=49$;对照组样本量= $1.962 \times 0.80 \times (1-0.80)/0.102=92$,研究样本多于最少估计例数,具有研究意义。

2 结果

2.1 3 种方法诊断泌尿系结核的检测结果及一致性比较 163 例疑似泌尿系结核患者中 CT 或 X 线片阳性患者 46 例。163 例标本以泌尿系结核临床诊断为“金标准”检出泌尿系结核 52 例(31.90%),Xpert MTB/RIF、结核杆菌固体培养与抗酸染色的检出率分别为 31.29%(51/163)、24.54%(40/163)和 23.93%(39/163),其检出率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。3 种实验室检测方法与泌尿系结核临床诊断比较,Xpert MTB/RIF 法和结核杆菌固体培养具有极强的一致性,涂片抗酸染色的一致性较弱,结果见表 1。

2.2 3 种诊断性试验的诊断效能评价 3 种诊断试验中,结核杆菌固体培养的特异度最高,Xpert MTB/RIF 灵敏度最高,而涂片抗酸染色的灵敏度和特异度均不佳。见表 2。

表 1 3 种方法诊断泌尿系结核的检测结果

诊断性试验	金标准临床诊断法(<i>n</i>)		Kappa 值	<i>u</i>	一致性程度
	泌尿系结核(<i>n</i> =52)	非泌尿系结核(<i>n</i> =111)			
Xpert MTB/RIF			0.815	16.61	极强
阳性	45	6			
阴性	7	105			
抗酸染色法			0.319	3.70	弱
阳性	23	16			
阴性	29	95			
结核杆菌固体培养法			0.819	16.34	极强
阳性	40	0			
阴性	12	111			

表 2 3 种诊断性试验的诊断效能评价(*n*)

诊断性能	Xpert MTB/RIF	抗酸染色	结核杆菌固体培养
灵敏度	86.54	44.22	76.92
特异度	94.59	85.59	100.00
正确指数	81.13	29.82	76.93
符合率	92.02	72.39	92.63
阳性预测值	88.24	58.97	100.00
阴性预测值	93.75	76.61	90.24

3 讨 论

泌尿系结核是 EPTB 最常见的一个类型,由于该类患者缺乏特异性临床症状,其诊断是医学上的一大难题。目前泌尿系结核的实验室诊断方法包括抗酸或荧光染色镜检、固体或液体培养。镜检方法廉价快速,但是灵敏度低,对人员素质要求高,容易导致漏诊;培养方法特异度强,但是通常需要 6~8 周才能获得结果,无法满足临床快速早期诊断的需求。鉴于传统诊断方法的固有缺点,急需一种快速、灵敏、特异度高的新型诊断方法。Xpert MTB/RIF 检测技术是 WHO 在 2010 年 12 月推荐用于肺结核诊断的一种新技术,在痰或灌洗液标本的检测中表现出优异的特性^[11],但是其在泌尿系结核诊断中的价值尚缺乏研究数据。本研究应用一致性检验评估抗酸染色镜检、结核杆菌固体培养和 Xpert MTB/RIF 分析法在泌尿系结核诊断中的价值。

本研究以临床综合诊断作为泌尿系结核诊断的“金标准”,评估 3 种诊断试验的性能,结果显示,Xpert MTB/RIF 法(Kappa 值=0.815)和结核杆菌固体培养法(Kappa 值=0.819)与临床诊断具有极强的一致性,而抗酸染色镜检(Kappa 值=0.319)的一致性较弱。3 种方法的检出率比较差异有统计学意义($\chi^2=43.09, P<0.05$),Xpert MTB/RIF 法(31.29%)检出率明显高于抗酸染色镜检(23.93%)和结核杆菌固体培养法(24.54%),但与临床诊断的“金标准”检

出率(31.90%)基本一致。研究数据表明在检测尿样中的结核分支杆菌上,Xpert MTB/RIF 的性能优于涂片抗酸染色和结核杆菌固体培养法。上述方法灵敏度的差异主要取决于它们的检测极限。在这 3 种方法中,涂片抗酸染色需要 $5\times 10^3\sim 1\times 10^4$ CFU/mL 才能产生阳性结果,而 Xpert MTB/RIF 试验的检测极限报告为 131 CFU/mL^[12-13]。结核分枝杆菌固体培养检测极限有报道称为 10~100 CFU/mL,但在本研究中其灵敏度低于 Xpert MTB/RIF。其原因可能是 Xpert MTB/RIF 通过检测死亡细菌细胞中的残留 DNA 而得到增强,而培养中标本不能及时处理和使用 4%NaOH 消化液消化可能导致部分活菌死亡并导致培养的灵敏度下降。涂片抗酸染色检测极限差,需要较高的细菌浓度才能检测出阳性。另外一个导致尿涂片抗酸染色灵敏度较差的原因是尿液的非黏性质降低标本中抗酸杆菌在玻片的稳固性,从而降低尿样中涂片的阳性率^[14]。涂片抗酸染色特异度较低主要由于非典型分支杆菌的存在导致“假阳性”结果和染色不佳时抗酸颗粒影响阅片。尽管有这些缺点,涂片抗酸染色对于 EPTB,特别是在结核病高负担地区仍然是一种廉价、快速有效益的筛查方法。

3 种结核分支杆菌诊断方法在泌尿系结核诊断中结核杆菌固体培养法特异度最强,是泌尿系结核确诊的一个重要依据,并且可以为治疗提供药物灵敏度试验,但是培养时间长限制了其广泛应用。尿沉渣抗酸染色镜检价格低廉,实验室要求低,适合结核高发区泌尿系结核的快速筛查。由于其灵敏度和特异度均较差,需要多次重复检查。对于尿液非黏性特性提示需要改进技术,如在沉渣中加入无菌血清,从而提高结核分支杆菌的黏附性,以提高镜检的阳性率。Xpert MTB/RIF 检测技术不但具有较高的灵敏度,而且具有很高的特异度,可在 2 h 内快速对尿液样本中的结核分支杆菌进行检测,是一种快速高效的诊断泌尿系结核的方法,但是昂贵的费用对于发展中国家的患者是一种沉重的负担^[15]。Xpert MTB/RIF 技术

在尿液标本结核分支杆菌检测的灵敏度低于痰标本，其原因与泌尿系结核患者排菌量较低并且呈间断性有关，提示可以通过留取更多标本进行集菌后检测来提高其灵敏度。

4 结 论

3 种实验室检测方法与临床诊断“金标准”法比较，经 Kappa 检验，Xpert MTB/RIF 和固体培养法具有很高的一致性。研究数据表明 GeneXpert 在检测性能上优于涂片抗酸染色和结核杆菌固体培养，该方法可以为临床早期、快速诊断泌尿系结核提供实验室依据。

参考文献

[1] GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT. Global Tuberculosis Report 2018. [EB/OL]. (2018-08-09)[2019-05-27]. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

[2] PANG Y, AN J, SHU W, et al. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis among inpatients, China, 2008—2017 [J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(3): 457-464.

[3] OHENE S A, BAKKER M I, OJO J, et al. Extra-pulmonary tuberculosis: a retrospective study of patients in Accra, Ghana [J]. PLoS ONE, 2019, 14(1): e0209650.

[4] 李秀武, 刘建强, 郑荣坤. FQ-PCR 技术在肺外结核中的诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(12): 818-821.

[5] ABBARA A, DAVIDSON R N. Etiology and management of genitourinary tuberculosis [J]. Nat Rev Urol, 2011, 8(12): 678-688.

[6] 李波, 吴进凤, 欧喜超, 等. 荧光染色镜检、改良罗氏培养

在肺结核实验室诊断中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(7): 1165-1168.

[7] 唐书福, 刘权贤, 张建勇, 等. 胸腔镜联合胸水 gene-Xpert 在结核性胸膜炎中的诊断评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(22): 3434-3437.

[8] 蔡侃儒, 彭巧丽, 汪文斐, 等. 支气管肺泡灌洗液 Xpert MTB/RIF 检测在 HIV 感染者肺结核诊断中的应用价值[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(6): 544-547.

[9] 中华医学会. 临床诊治指南(结核病分册)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 64-86.

[10] 夏邦世, 吴金华. Kappa 一致性检验在检验医学研究中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 83-84.

[11] 杜鹏, 郑文斌, 卢留珠, 等. Xpert MTB/RIF 和荧光定量 PCR 在痰液标本中快速检测结核分支杆菌的比较[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(4): 656-659.

[12] 张佳, 冯晓燕, 张贺秋, 等. 结核分支杆菌的富集方法及其在检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(22): 2813-2816.

[13] 范秀博, 闫菊娥, 李毓新, 等. Xpert Mtb/RIF 技术在结核性脑膜炎诊断中的应用[J]. 山东医药, 2017, 57(43): 61-63.

[14] PANG Y, SHANG Y, LU J, et al. GeneXpert MTB/RIF assay in the diagnosis of urinary tuberculosis from urine specimens [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1-5.

[15] HSIANG E, LITTLE K M, HAGUMA P, et al. Higher cost of implementing Xpert MTB/RIF in Ugandan peripheral settings: implications for cost-effectiveness [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(9): 1212-1218.

(收稿日期: 2019-03-16 修回日期: 2019-05-28)

(上接第 2744 页)

分析仪加样系统的校准, 对人员、环境条件、设备等要求较低, 简单易行^[8,10]。

4 结 论

合理设置分析方法, 使全自动生化分析仪按照特定比例对标准物质 BW 2025-1 进行稀释, 改良传统比色法, 可实现全自动生化分析仪试剂与样本加注重复性和准确度的测试、评估(校准)。该方法简单、便于操作, 受影响因素少, 可操作性强^[9-10]。

参考文献

[1] 张蕊, 刘丽丽. 简述生化分析仪标准物质的研究现状及发展趋势[J]. 科技与企业, 2013, 22(6): 365-366.

[2] 国家食品药品监督管理总局. 全自动生化分析仪: YY/T 0654—2017[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2017.

[3] 邱玲. ISO 15189 评审自动生化分析仪使用中的常见不符合项及解决方案[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志,

2015, 4(3): 198-201.

[4] 万卓. 全自动生化分析仪校准方法[J]. 化学计量与分析技术, 2016, 22(6): 180-182.

[5] 金鑫. 全自动生化分析仪 ADVIA2400 校准方法探讨[J]. 化学计量与分析技术, 2017, 26(5): 181-183.

[6] 王艳秋, 于群, 周玉贵, 等. 医药行业标准 YY/T 0654—2008 在评价生化分析仪性能中的应用[J]. 临床检验杂志, 2013, 12(31): 891-893.

[7] 王志伟, 倪蓝, 魏军. 全自动生化分析仪校准存在的问题[J]. 检验医学, 2014, 12(29): 1260-1262.

[8] 杨晓英. 《全自动生化分析仪校准规范》编制说明[J]. 计量与测试技术, 2016, 5(43): 104-105.

[9] 李名兆. 浅谈全自动生化分析仪的校准[J]. 中国测试技术, 2004, 5(30): 26-28.

[10] 杨彦琴, 安徽. 生化分析仪计量检定的研究[J]. 医疗设备信息, 2000, 15(3): 1-2.

(收稿日期: 2019-03-26 修回日期: 2019-06-08)