

metaanalysis. J Infect, 2012, 64: 580-588.

[8] Bates M, O'Grady J, Maeurer M, et al. Assessment of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis with gastric lavage aspirates in children in sub-Saharan Africa: a prospective descriptive study[J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(1):36-42.

[9] Coetzee L, Nicol M P, Jacobson R, et al. Rapid diagnosis of pediatric mycobacterial lymphadenitis using fine needle aspiration biopsy[J]. Pediatr Infect Dis J, 2014, 33(9):893-896.

[10] Lacourse S M, Chester F M, Preidis G, et al. Use of Xpert for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in severely malnourished hospitalized Malawian children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2014, 33(11):1200-1202.

[11] Nicol M P, Workman L, Isaacs W, et al. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(11):819-824.

[12] Nicol M P, Spiers K, Workman L, et al. Xpert MTB/RIF testing of stool samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children[J]. Clin Infect Dis, 2013, 57(3):e18-e21.

[13] Pang Y, Wang Y, Zhao S, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay in gastric lavage aspirates for diagnosis of smear-negative childhood pulmonary tuberculosis[J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 2014, 33:1047-1051.

[14] Reither K, Manyama C, Clowes P, et al. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: A prospective, multi-centre evaluation[J]. J Infect, 2014.

[15] Sekadde M P, Wobudeya E, Joloba M L, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis in Uganda: a cross-sectional diagnostic study[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13:133.

[16] 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(2):442-447.

[17] Walters E, Goussard P, Bosch C, et al. GeneXpert MTB/RIF on bronchoalveolar lavage samples in children with suspected complicated intrathoracic tuberculosis: a pilot study[J]. Pediatr Pulmonol, 2014, 49(11):1133-1137.

[18] Zar H J, Workman L, Isaacs W, et al. Rapid molecular diagnosis of pulmonary tuberculosis in children using nasopharyngeal specimens[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(8):1088-1095.

[19] Zar H J, Workman L, Isaacs W, et al. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in African children in a primary care setting by use of Xpert MTB/RIF on respiratory specimens: a prospective study[J]. Lancet Glob Health, 2013, 1(2):e97-e104.

[20] 周蕾, 王海, 朱明利. Xpert 结核分枝杆菌 / 利福平试验快速诊断儿童结核病及其耐药性的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014(23):3490-3492.

[21] Dodd PJ, Gardiner E, Coghlan R, Seddon JA. Burden of childhood tuberculosis in 22 high-burden countries: a mathematical modelling study. Lancet Glob Health, 2014, 2(8):e453-459.

[22] Titone L, Romano A, Abbagnato L, et al. Epidemiology of paediatric tuberculosis today. Infez Med, 2003, 11(3):127.

[23] Li L, Duanmu HJ. The epidemic of childhood tuberculosis in China. Zhonghua yi xue za zhi, 2004, 84(20):1678.

[24] 成诗明, 杜昕, 徐敏. 1992-2004 年全国儿童新发现的痰涂片阳性肺结核监测与分析. 中华儿科杂志, 2006, 44:257-261.

[25] Marais BJ, Robert P. Gie R, et al. Childhood pulmonary tuberculosis old wisdom and new challenges. American journal of respiratory and critical care medicine, 2006, 173(10):1078-1090.

[26] Nicol MP, Zar HJ. New specimens and laboratory diagnostics for childhood pulmonary TB: progress and prospects [J]. Paediatr Respir Rev, 2011, 12 (1) : 16-21.

[27] 张俊, 徐志伟, 李克等. 诊断性试验 Meta 分析的效应指标评价 [J]. 中国循证医学杂志, 2013, 13(7):890-895.

## 交叉引物核酸恒温扩增技术在基层实验室诊断肺结核病的研究

李辉<sup>1\*</sup> 靳晓伟<sup>2</sup> 马晓光<sup>1</sup> 区喜超<sup>3</sup> 杨洪毅<sup>1</sup> 赵玉玲<sup>1</sup> 闫国蕊<sup>1</sup> 邢进<sup>1</sup> 赵雁林<sup>3</sup>

1. 河南省疾病预防控制中心结核病参比实验室 461005

2. 新密市疾病预防控制中心结核病所

3. 中国疾病预防控制中心结核病预防控制所 国家结核病参比实验室

**【摘要】目的** 评价交叉引物核酸恒温扩增技术 (Cross-Priming Amplification, CPA) 在基层实验室诊断肺结核病的应用价值。**方法** 从河南省县级结核病门诊连续纳入就诊的肺结核可疑患者 682 例, 收集纳入病人的痰标本开展涂片、培养、菌型鉴定和 CPA 检测。**结果** 剔除培养和 CPA 检测失败者 4 例, 共获得 678 例合格可疑患者, 1356 份痰标本同时进行培养和 CPA 检测。以菌型鉴定后的培养结果为金标准比较, CPA 检测 1356 份痰标本的敏感性、特异性和符合率分别为 85.71%、98.92% 和 97.42% (Kappa=0.868);

CPA 检测 56 例涂阴培养痰标本的敏感性为 64.29%。**结论** CPA 作为简单、快速的分子方法检测痰标本中的结核杆菌有较高的敏感性和很高的特异性，适于基础实验室对肺结核病患者的诊断。

**【关键词】** 结核病；CPA；诊断；

## An evaluation of Cross-Priming Amplification for diagnosis of pulmonary Tuberculosis in peripheral laboratory

LI Hui\*, JI Xiao-wei, MA Xiao-guang, OU Xi-chao, YANG Hong-yi, ZHAO Yu-ling, YANG Guo-rui, XING Jin, ZHAO Yan-lin.

**【Abstract】 Objective** To evaluate the capability of Cross-Priming Amplification (CPA) for detection of Mycobacterium Tuberculosis to diagnose pulmonary tuberculosis in peripheral laboratory. **Methods** The 682 persons having suspicious pulmonary tuberculosis were successively enrolled in county-level tuberculosis outpatient of Henan, the sputum sample from enrolled persons were collected and detected using smear microscopy, media culture, isolate identification and CPA. **Results** The 678 legal participants except 4 failed in media culture and CPA got 1356 sputum samples for media culture and CPA, comparing with the result of media culture after isolate identification, the sensitivity and specificity and accordance of CPA in 1356 sputum samples is 85.71%、98.92% 和 97.42% (Kappa=0.868), the sensitivity of CPA in 56 smear- negative, culture-positive sputum samples is 64.29%. **Conclusion** The cross-priming amplification assay is rapid, simple and hand-free molecular tool with high sensitive and specific for detection of Mycobacterium tuberculosis. It can be used for diagnosis pulmonary tuberculosis in peripheral laboratory.

**【Key words】** Tuberculosis; Cross-prime amplification; Diagnosis

在我国基层结核病实验室承担着主要的肺结核患者发现工作，但其对肺结核患者的检测手段极其有限，主要依靠痰标本的涂片显微镜检查。痰涂片镜检虽然对于发现高传播危险的涂阳肺结核患者有着重要意义，但由于该方法检测敏感性较差，对肺结核患者的诊断有一定局限性。痰标本培养虽然灵敏度相对较高，但该方法对实验室生物安全要求高，且培养周期较长（3～8周），影响了在基层实验室的普及。随着分子生物学技术和结核杆菌基因组学的发展，多种利用核酸检测技术来诊断结核病的方法被建立，如实时荧光定量 PCR、转录酶扩增 (Transcription Mediated Amplification, TMA)、恒温核酸扩增等等<sup>[1]</sup>。其中恒温核酸扩增技术是近期分子诊断的研究热点，有着较好的应用前景，由杭州优思达公司开发的 EasyNAT™ 结核分枝杆菌恒温扩增核酸试纸条检测法利用交叉引物核酸恒温扩增技术 (CPA) 将病原体 DNA 扩增、核酸杂交和核酸试纸条检测融为一体<sup>[2]</sup>，一次性完成核酸的扩增及杂交过程，然后用防污染核酸快速检测装置对结核杆菌感染进行定性诊断，整个操作简单方便易于使用。现对 CPA 在基层结核病实验室诊断肺结核病的检测效能进行评估。

### 对象和方法

#### 一、研究对象

在河南省新密市县级结核病门诊连续纳入就诊的初治肺结核可疑患者，经研究对象知情同意后，收集痰标本进行检测，病人诊断按照《肺结核诊断标准》<sup>[3]</sup> (WS-288 2008) 进行。排除痰标本不合格者及病例资料不完善者，以及培养污染或 CPA 检测失败病例。收集了 682 例患者痰标本，剔除 1 例培养污染 (0.15%)，3 例 CPA 检测失败 (4.4%)，共纳入 678 例合格可疑患者；男 505 例 (74.48%)，女 173 例 (25.52%)；年龄 8～97 岁，平均年龄 (55.85±17.50) 岁。

#### 二、研究方法

1. 标本采集：可疑肺结核患者的痰标本按照《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》<sup>[4]</sup> 要求进行，采集研究对象三份痰标本（及时痰、晨痰和夜痰），经实验室人员鉴别标本性状，对标本质量不合格者重新收集痰液，如重新收集的痰标本有一份不能达到要求，该可疑患者就要排除于项目外。

2. 显微镜检查和分离培养：对符合要求的痰标本按照《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》要求进行萇-尼氏染色显微镜检查。痰标本培养，选取三份标本中二份阳性级别高的标本，或一份阳性标本

及一份性状好的阴性标本,或二份标本性状好的阴性标本进行培养。培养操作严格按照《结核病诊断实验室检验规程》<sup>[5]</sup>碱处理简单法进行,接种于酸性改良罗氏培养基(贝索公司)上。

3. 菌种鉴定:痰标本分离培养的阳性产物进行 16S ~ 23S rDNA ITS 测序<sup>[6]</sup>,鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌(NTM),测序上游引物 5'-GGCCTAACCTCGGGAGGGAG-3';下游引物 5'-CCCGAGGCATATCGCAGCCTC-3'。由国家结核病参比实验室进行测序。

4. CPA 检测:对进行培养的痰标本同时进行 CPA 检测,操作按照 CPA 说明书进行操作,简述如下。

痰液中加入 4%NaOH 溶液,常温消化,消化后高速离心,离心沉淀用无菌生理盐水洗涤;洗涤后的沉淀物加 DNA 提取液,经 95 ~ 100℃裂解后高速离心;离心后上清液加入装有玻璃化试剂的反应管中,依次加入复溶缓冲液、石蜡油和 ddH<sub>2</sub>O;混匀后的试管置恒温仪或水浴箱,63℃温浴 60min 进行核酸扩增杂交;将扩增后的反应管放入核酸检测装置中,15 ~ 30min 内通过阅读窗判读结果,30min 后判读无效。

5. 质量控制:新密市结核病实验室痰检质量由河南省结核病参比实验进行质量控制,质控结果符合《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》要求;新密市结核病实验室痰分离培养年污染率小于 5%。

6. 统计学分析:应用 SPSS21 统计软件对 CPA 与不同检测方法进行敏感度和特异度分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义;对 CPA 与金标准痰培养进行一致性比较(Kappa),Kappa 值 $\geq 0.75$ 认为二者一致性很好<sup>[7]</sup>。

## 结果

### 一、诊断情况

纳入的 678 例患者按照《肺结核诊断标准》(WS-288 2008),诊断为结核病患者 278 例,诊断为非结核患者 400 例。

### 二、细菌学和鉴定结果

678 例纳入患者标本痰检阳性者 58 例(8.55%);培养阳性 91 例,经菌种鉴定有 5 例 NTM,结核杆菌为 86 例,培养阳性率为 12.68%。678 例患者共采集痰标本 2034 份,按照每位患者培养 2 份痰标本,共有 1356 份痰标本开展了培养,其中结核杆菌培养阳性 154 份(11.36%),镜检阳性 104 份(7.67%)。

### 三、CPA 检测结果

678 例纳入患者标本 CPA 检测阳性 78 例(11.50%);1356 份痰标本 CPA 检测阳性 145 例(10.69%)。以鉴定后培养结果为标准,检测 1356 份痰标本,涂片的检测敏感性、特异性分别为 63.64%、99.50%;CPA 的检测敏感性、特异性和符合率分别为 85.71%、98.92% 和 97.42% (Kappa=0.868)。CPA 与涂片检测痰标本的敏感性、特异性差异均有统计学差异( $\chi^2=0.00, P=308.00$ ;  $\chi^2=0.000, P=2404.00$ )。

1356 份痰标本有即时痰 398 份、晨痰 560 份、夜痰 398 份;以鉴定后的培养结果为标准,CPA 检测即时痰、晨痰和夜痰的阳性率为 10.30%、11.25%、10.30%,敏感性和特异性分别为 86.67%、87.69%、81.82% 和 99.43%、98.79%、98.59%。CPA 检测三类痰标本的灵敏度和特异度差异有统计学意义( $\chi^2=0.00, P=154.00$ ;  $\chi^2=0.000, P=1202.00$ )。

1356 份痰标本中涂片和培养均阳性 98 例,其中 CPA 检测阳性 96 例,敏感性为 97.96%;1356 份痰标本中涂片阴性而培养阳性 56 例,CPA 检测阳性 36 例,敏感性为 64.29%。

678 例纳入患者中痰检阳性患者 58 例,其中两份标本检测均阳性 46 例(79.31%);痰培养 86 例患者阳性,两份标本均阳性者 68 例(79.07%),CPA 检测 78 例阳性,两份标本均阳性者 67 例(85.90%)。痰检、培养和 CPA 检测同一患者两份标本重复性差异有统计学意义( $\chi^2=0.00, P=222.00$ )。

## 讨论

由于核酸恒温扩增技术是在同一温度下完成扩增反应的全过程,不必象 PCR 反应那样经历几十个温度变化的循环过程,这一特点使得该技术对仪器精密程度的依赖大大简化,同时也大大缩短了反应时间,使其成为了分子检测的焦点。恒温扩增技术在结核病实验室检测中已经发展出了多种方法,除有 CPA 外,我国已经市场化的还有环介导等温扩增(Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP)、实时荧光核

酸恒温扩增检测 (Simultaneous Amplification and Testing, 简称 SAT)。研究报告显示<sup>[8-11]</sup>对痰标本或痰培养物的检测, LAMP 和 SAT 达到了较高的灵敏度 (88.80% ~ 100%) 和特异性 (92% ~ 97.5%), 这于恒温扩增的高效性密切相关。本研究中 CPA 检测痰标本显示了与 LAMP 和 SAT 一致的高特异性 (98.99%), 虽然 CPA 检测敏感性 (83.72%) 略低于另两种方法, 但与培养结果有很高的一致性 (Kappa=0.868), 且其检测涂片和培养均阳性标本的显示了很高的敏感性为 97.96%。

涂阴结核病患者的确诊是实验室检测到的难点, 传统主要依靠培养, 分子检测时间较短是较理想的检测手段。GeneXpert 是 WHOT 推荐的检测结核病的理想方法, 研究显示其对涂阴培养阳性患者的敏感性为 70 ~ 76.9%<sup>[12-13]</sup>, 而 LAMP 检测涂阴培养结核病患者患者的敏感性为 53% ~ 55.6%<sup>[11]</sup>, 本研究 CPA 的敏感性为 64.29%, 虽低于 GeneXpert 但仍高于 LAMP 的检测灵敏度。

国家结核病防治规划对结核病患者的结核病实验室检测要求收集可疑患者的三份痰标本进行涂片染色显微镜检查, 并对其中的二份痰标本进行结核杆菌的分离培养。增加检查的标本数量能提高结核病患者的发现率, 本研究也显示增加涂片、培养和 CPA 检测的标本数量均能提高阳性检出率。但 CPA 与涂片和培养比较, 对同一患者两份标本检测的阳性符合率要显著的高于涂片和培养, 提示 CPA 检测一份痰标本就能获得很好的阳性结果, 特别是对晨痰的检测阳性率更高。

由于发展中国家资源的有限性, 世界卫生组织 (WHO) 提出了针对资源有限国家实验室诊断产品的性能目标 - ASSURED 原则, 即 Affordable- 低廉、Sensitive- 敏感、Specific- 特异、User-friendly 使用方便、Rapid/Robust- 快速和稳定、Equipment-free- 无仪器、Deliverable- 易运输。基于 CPA 技术的 EasyNAT™ 结核分枝杆菌恒温扩增核酸试纸条方法所用的试剂为玻璃化粉剂和核酸检测盒均可以在常温下保存和运输; 扩增阶段可在水浴锅或金属浴等简单仪器上完成, 结果以条带方式显示在试纸条上, 不需要借助其他设备观察; 核酸扩增和检测可在 1.5 小时内完成, 这些均贯彻了 ASSURED 原则。

总之, CPA 技术快速、简便, 检测痰标本中的结核杆菌有着较高的灵敏度和特异性, 适于基层实验室对结核病的诊断。

### 参考文献

- [1] 汪琳, 罗英, 周琦, 等. 核酸恒温扩增技术研究进展. 生物技术通讯, 2011, 22(2):296-302.
- [2] Rendong Fang, Xia Li, Lin Hu, et al. Cross-Priming Amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum specimens. *Journal of clinical microbiology*, 2009, 47(3):845-847.
- [3] 卫生部. 肺结核诊断标准 WS-288 2008.
- [4] 赵雁林, 姜广路. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册. 北京: 中国协和医学大学出版社, 2009.
- [5] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006.
- [6] Roth A, Fischer M, Hamid ME, et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of clinical microbiology*, 1998, 36(1):139-147. PMID: PMC124824
- [7] 李永红. 实验研究列联表资料的 SPSS 分析. 中国热带医学, 2007, 7(10): 1941-1944.
- [8] 陈涛, 周琳, 周杰, 等. 环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的临床应用评估. 中国防痨杂志, 2012, 34 (7) : 413-418.
- [9] 戴广明, 曹以诚, 杜正平, 等. 结核分枝杆菌环介导恒温扩增 (LAMP) 快速检测方法的评价. 中国防痨杂志, 2011, 33 (1) : 47-51.
- [10] Xichao Ou, Qiang Li, Hui Xia, et al. Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China. *PLoS One*, 2014, 9(5):e95455. PMID: PMC4006777
- [11] World Health Organization. The use of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay (TB-LAMP) for the detection of tuberculosis. Geneva: WHO/HTM/TB/2013.05.
- [12] Boehme CC, Nico MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. *Lancet*, 2011, 377(9776):1495-1505. PMID: PMC3085933
- [13] Moorine Peninah Sekadde1, Eric Wobudeya, Moses L Joloba, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis in Uganda: a cross-sectional diagnostic study. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:133. PMID: PMC3602671