

# XpertMTB\_RIF 和宏基因组测序技术在脊柱结核诊断中的临床应用

王 勃 张 峰 宋 臻 卢童新 张 强

山东省公共卫生临床中心骨关节外科二病区 济南市 250000

**【摘要】**目的：通过 C 型臂引导下经皮椎间盘穿刺技术及开放手术取材，分别应用 XpertMTB\_RIF (Xpert) 和宏基因组测序 (NGS) 技术对脊柱结核患者进行检测，对比分析两种方法对脊柱结核诊断的临床价值。材料与方法：收集 2019 年 2 月至 2021 年 8 月山东省公共卫生临床中心骨科收治的 285 例临床确诊为脊柱结核患者资料，其中男 149 例 (52.3%)，女 136 例 (47.7%)；年龄 18~85 岁 (45.7±17.6 岁)。均采用 C 型臂引导下经皮椎间盘穿刺或开放手术取材获得的标本，应用 XpertMTB\_RIF 和宏基因组测序技术进行检测。临床确诊以取材的结核杆菌罗氏培养或液体快速培养阳性；病理学检查为干酪样坏死、Langerhans 肉芽肿和/或符合结核样改变表现；临床症状、体征与影像学检查显示的结核病灶表现一致；规范抗结核治疗 6 个月及以上结核全身症状及局部症状消失；为标准判断是否存在结核分支杆菌感染。对比分析后判断 XpertMTB\_RIF 和宏基因组测序对结核分支杆菌感染的检测效能。结果：285 例临床确诊患者中，病理确诊为结核 181 例 (63.5%)，病理未确诊 104 例 (36.5%)，Xpert 检测阳性 238 例 (83.5%)，阴性 47 例 (16.5%)，NGS 检测阳性 263 例 (92.3%)，阴性 22 例 (7.7%)。NGS 检测阳性率高于 Xpert 检测 (P<0.05)。以病理学诊断做为金标准，病理诊断确诊为结核病的 181 例中，XpertMTB\_RIF 阳性 165 例，阴性 19 例，NGS 阳性 171 例，阴性 10 例；病理未确诊结核的 104 例中，XpertMTB\_RIF 阳性 63 例，阴性 41 例；NGS 阳性 65 例，阴性 39 例。XpertMTB\_RIF 的敏感度为 91.2% (165/181)，NGS 的敏感度为 94.5% (171/181)，两者对比有统计学差异 (P<0.05)，XpertMTB\_RIF 特异度为 39.4% (41/104)，NGS 特异度为 37.5% (39/104)，两者无统计学差异 (P>0.05)。病理检查与 XpertMTB\_RIF 检测联合诊断脊柱结核的阳性率为 96.1% (274/285)。结论：XpertMTB\_RIF 及宏基因组测序技术均可作为提高脊柱结核诊断率的有效方法，NGS 技术对比 Xpert 技术有更高的阳性率，两项技术联合应用可有效提高脊柱结核患者的诊断率。

**【关键词】**XpertMTB\_RIF 及宏基因组测序；脊柱结核诊断

Clinical application of XpertMTB\_RIF and metagenomic sequencing technology in the diagnosis of spinal tuberculosis

WANG Ceng, ZHANG Feng, SONG Zhen, LU Tongxin, ZHANG Qiang

(Second Ward of Bone and Joint Surgery, Shandong Public Health Clinical Center, Jinan 250000)

**【Abstract】** Objective: To use XpertMTB\_RIF (Xpert) and metagenomic sequencing (NGS) techniques to detect patients with spinal tuberculosis by C-arm guided percutaneous dispcuncture technology and open surgical materials, and to compare and analyze the clinical value of the two methods in the diagnosis of spinal tuberculosis. Materials and methods: Data were collected from 285 clinically confirmed patients with spinal tuberculosis admitted to the Department of Orthopedics of Shandong Public Health Clinical Center from February 2019 to August 2021, including 149 males (52.3%) and 136 females (47.7%). Age 18~85 years old (45.7±17.6 years old). All samples obtained by C-arm guided percutaneous disc puncture or open surgical material were detected by XpertMTB\_RIF and metagenomic sequencing technology. Clinically confirmed positive Roche culture or rapid liquid culture of Mycobacterium tuberculosis; Pathology findings are caseous necrosis, Langerhans granuloma, and/or tuberculous findings; Clinical symptoms and signs are consistent with tuberculosis lesions on imaging; Standardize anti-tuberculosis treatment for 6 months and above, and the systemic symptoms and local symptoms of tuberculosis disappear; It is a criterion for determining the presence or absence of Mycobacterium tuberculosis infection. After comparative analysis, the efficacy of XpertMTB\_RIF and metagenomic sequencing on Mycobacterium tuberculosis infection was judged. Results: Among the 285 clinically confirmed patients, 181 (63.5%) were pathologically confirmed as tuberculosis, 104 (36.5%) were pathologically undiagnosed, 238 (83.5%) were positive for Xpert, 47 (16.5%) were negative, 263 (92.3%) were positive for NGS and 22 (7.7%) were negative. The positive rate of NGS test was higher than that of Xpert test (P<0.05). Taking pathological diagnosis as the gold standard, among the 181 cases diagnosed with pathological diagnosis of tuberculosis, 165 cases were positive for XpertMTB\_RIF, 19 cases were negative, 171 cases were positive for NGS and 10 cases were negative. Among the 104 cases of pathological undiagnosed tuberculosis, 63 cases were XpertMTB\_RIF positive and 41 were negative; There were 65 positive cases of NGS and 39 cases of negative results. The sensitivity of XpertMTB\_RIF was 91.2% (165/181) and that of NGS was 94.5% (171/181), and there were statistical differences between the two (P<0.05), XpertMTB\_RIF specificity of 39.4% (41/104), and NGS specificity of 37.5% (39/104), and there was no significant difference between the two (P>0.05). The positive rate of pathological examination and XpertMTB\_RIF detection in the diagnosis of spinal tuberculosis was 96.1% (274/285). Conclusion: Both XpertMTB\_RIF and metagenomic sequencing technology can be used as effective methods to improve the diagnosis rate of spinal tuberculosis, NGS technology has a higher positive rate than Xpert technology, and the combined application of the two technologies can effectively improve the diagnosis rate of spinal tuberculosis patients.

**【Keywords】**XpertMTB\_RIF and metagenomic sequencing; Diagnosis of spinal tuberculosis

脊柱结核是最常见的肺外结核，有较高的耐药率和极高的致残率，对患者的生活质量影响甚重，而且其发病率逐年增高，加重我国卫生支出负担，是重要的公卫问题。[1] 因病原学细菌培养收到抗生素应用影响周期长、阳性率低，远不能满足脊柱结核的早期诊断治疗。病理学检查需要对组织标本进行脱水、包埋、切片、染色、封片等步骤，显微镜下以发现中心区域干酪样坏死组织、多核巨细胞、类上皮细胞、淋巴细胞及成纤维细胞组成的典型结核性肉芽肿等特征性表现来做出结核诊断，对于不典型的肉芽肿型病理结果，可能将麻风病、布鲁氏菌病、真菌性感染以及非结核分枝杆菌 (NTM) 等肉芽肿性炎症误诊为结核。美国 Cepheid 公司研发生产了结核分枝杆菌及利福平耐药基因实时荧光定量核酸扩增检测技术 (Xpert MTB/RIF) [2]，可在 2 小时内对结核分枝杆菌和利福平耐药基因进行检测，敏感度和特异度均较高，对比分枝杆菌培养鉴定及药敏试验有着既方便快捷又准确敏感的优势 [3]。大量研究证实 Xpert MTB/RIF 检验方法在脊柱结核标本的检验中具有可行性和准确性 [4]。WHO 正式推荐 Xpert MTB/RIF 检测可应用于肺外结核的快速诊断 [5]。此项分子生物学检查方法方便快捷，在脊柱结核的诊断中有着举足轻重的地位 [4-6]。宏基因组测序技术 (metagenomic next generation sequencing, mNGS)，属于分子生物学检测技术，它采用高通量测序，可做到准确、高效和低成本，理论上可以检测样本中所有病原微生物，该项技术已应用于临床上所见的复杂、罕见、混合感染性疾病的诊断 [7]。

mNGS 的主要优势在于可诊断复杂的感染性疾病 [8]。mNGS 技术目前应用于脊柱感染病原微生物的临床诊断，对于制订早期、精准的治疗方案有着非常重要的作用 [9]，但是 mNGS、Xpert 检测、病理检查应用于脊柱结核诊断的对比临床研究较少。本研究回顾性统计分析本中心 285 例脊柱结核患者的临床资料，通过穿刺或开放手术获得病灶，采用 mNGS、Xpert 检测、病理检查，对结果进行对照，得出检验方法对脊柱结核诊断敏感度、特异性的差异，分析宏基因组测序技术在脊柱结核诊治过程中的临床意义。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 2 月至 2021 年 8 月山东省公共卫生临床中心骨科收治的 285 例临床确诊为脊柱结核患者资料，其中男 149 例 (52.3%)，女 136 例 (47.7%)；年龄 18~85 岁 (45.7±17.6 岁)。285 例患者中：胸椎结核 107 例 (37.5%)，腰椎结核 102 例 (35.8%)，颈椎结核 7 例 (2.45%)，胸腰椎结核 30 例 (10.5%)，腰骶椎结核 36 例 (12.6%)，颈胸椎结核 3 例 (1.05%)。纳入标准：(1) 取材的结核杆菌罗氏培养或液体快速培养阳性；(2) 病理学检查为干酪样坏死并朗格汉斯肉芽肿和/或符合结核样改变表现；(3) 临床症状、体征与影像学发现的结核病灶影像学表现一致；(4) 规范抗结核治疗 6 个月及以上结核全身及局部症状消失。排除标准：排除标准：(1) 患者诊断为脊柱肿瘤；(2) 病理学检查显示脊柱无菌性炎症的骨质破坏者；(3) 化脓菌导致的脊柱化脓性

感染；(4) Xpert MTB/RIF 结果不确定的患者。

1.2 Xpert MTB/RIF 检测及分析: Xpert 检测技术是一种半巢式实时荧光 PCR 体外诊断技术,可自动扩增结核分枝杆菌及利福平耐药基因核酸进行检测分析。因为利福平敏感结核杆菌的 *rpoB* 基因核酸序列高度相同,利福平耐药结核分枝杆菌的 *rpoB* 基因突变率在 95%以上,所以检测中只要发现 *rpoB* 基因就可判断存在结核分枝杆菌,发现存在 *rpoB* 基因突变既可发现利福平耐药菌株。以结核分枝杆菌 *rpoB* 基因设计重叠的探针 5 条,以芽孢杆菌基因设计对照探针 1 条作为第 6 条探针,阴性结果为 5 条检测探针均无荧光释放,第 6 条探针释放荧光;阳性结果且利福平敏感为 5 条检测探针均释放荧光;阳性结果且利福平耐药为 5 条检测探针中有 1 条或者多条探针未释放出荧光,既检测探针释放荧光但不完全。具体方法:依照《结核病诊断实验室检验规程》[8],液态标本通过 N-acetyl-L-cysteine (NALC)-sodium hydroxide 法进行处理。固态标本加入适量磷酸盐缓冲液后应用研磨机进行打浆混匀法进行处理。试管中加入 1ml 标本液,再加入 2ml 标本处理液,盖紧试管塞后在振荡器上振荡 15 秒混匀,静置 15 分钟,重复此操作,即使试验标本充分液化混匀悬浊。Xpert 反应试剂盒内滴入 2ml 混匀的液化标本,检测模块中放入滴入处理后的试剂盒,启动仪器进行检测得出结果。

1.3 mNGS 检测及分析:低温保存标本,利用物理研磨+生物酶解实现高效破壁,提升胞内菌、真菌检出率。利用微生物 DNA 提取试剂盒对标本进行 DNA 的提取纯化。构建宏基因组文库,每种病原体针对多拷贝区域设计  $\geq 3$  对特异性引物序列,重要基因设计引物高达 9 对,靶向富集,无宿主干扰、增加敏感性。Inline-Code 技术超低微量(DNA/RNA 共测序)的建库,对文库分析精确定量。采用 Oxford Nanopore Technology(ONT)的纳米孔测序仪测序平台进行高通量测序,高通量三代测序,平均读长 2000bp 精准鉴定到种属水平,更适合于耐药基因检测。数据基本过滤去除低质量碱基(Q 值  $\leq 10$ ) 超过 50%的序列、数据超过 10% 序列以及测序接头序列,过滤后的数据与人类基因组参考序列进行比对,去除人类基因组的相关序列,采用病原微生物数据库对照,将剩余微生物基因序列与数据库基因序列进行比对分析,得出病原体的定性结果和定量结果。

1.4 统计学处理 试验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。敏感度:真阳性数/真阳性数+假阴性数  $\times 100\%$ , 特异度:真阴性数/真阴性数+假阳性数  $\times 100\%$ , 计数结果以例(%)表示;正态分布数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ), 两组数据比较采用 t 检验; Xpert 和 mNGS 数据比较使用  $\chi^2$  检验。当 P 值  $< 0.05$  得差异具有统计学意义。

## 2 结果

本研究 285 例临床确诊患者中,病理确诊为结核 181 例(63.5%),病理未确诊 104 例(36.5%),Xpert MTB/RIF 检测阳性 238 例(83.5%),阴性 47 例(16.5%),NGS 检测阳性 263 例(92.3%),阴性 22 例(7.7%)。NGS 检测阳性率高于 Xpert MTB/RIF 检测 ( $P < 0.05$ )。以病理学诊断做为金标准。病理学诊断为结核病的 181 例患者中,Xpert MTB/RIF 阳性 165 例,阴性 19 例,NGS 阳性 171 例,阴性 10 例;病理未确诊结核的 104 例中,Xpert MTB/RIF 阳性 63 例,阴性 41 例;NGS 阳性 65 例,阴性 39 例。Xpert MTB/RIF 的敏感度为 91.2% (165/181), NGS 的敏感度为 94.5% (171/181), 两者对比有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), Xpert MTB/RIF 特异度为 39.4% (41/104), NGS 特异度为 37.5% (39/104), 两者无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。病理检查与 Xpert MTB/RIF 检测联合诊断脊柱结核的阳性率为 96.1% (274/285)。

结论: Xpert MTB/RIF 及宏基因组测序技术均可作为提高脊柱结核诊断率的有效方法, mNGS 技术对比 Xpert 技术有更高的阳性率, 两项技术联合应用可有效提高脊柱结核患者的诊断率。

## 讨论

脊柱结核的发病率及耐药率呈增长趋势, 由于发病隐匿且病程较长, 发病早期症状不明显往往患者所忽视, 直到出现脊柱骨质破坏导致疼痛、巨大脓肿形成、窦道形成甚至神经功能障碍后才被发现和重视 [10, 11]。病原学及病理学检查是脊柱结核确诊的金标准, 但结核分枝杆菌培养操作复杂、周期过长、阳性率较低; 非结核分枝杆菌 (NTM) 的合并感染以及抗结核药物的不规范用药应用降低了结核分枝杆菌培养的阳性率且增加了耐药率; 除非晚期典型干酪样坏死组织, 病理学诊断往往得出肉芽肿性炎、炎性肉芽组织等非特异性报告, 二者均无法满足临床早期诊断早期治疗的需要 [12-13]。Xpert MTB/RIF 作为方便快捷准确的分子生物学检测技术, 在结核病的诊断中有着非常重要的地位 [14], 不仅在肺结核, 而且在肺外结核的早期诊断中也具有极其重要的应用价值 [15]。李祯等 [16] 根据脊柱结核诊断标准发现 Xpert MTB/RIF 具有高敏感度 (78.7%)。王等 [17] 发现 Xpert MTB/RIF 检测的敏感度 (85.27%) 显著高于病理检查 (73.04%)。本研究发现 Xpert MTB/RIF 对结核分枝杆菌诊断敏感度 91.2% (165/181), mNGS 敏感度为 94.5% (171/181), 两者对比有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 两组数据的敏感度均较高, 考虑与本研究入组主要依靠病原学及病理学诊断依据有关。同时取材方式的不同 (窦道取材、置管引流、穿刺活检、开放手术) [18]、取材性质 (干酪样坏死组织、病变肉芽组织和脓液) [19] 所获取的 Xpert MTB/RIF 检测结果敏感度均有较大差异。本研究发现 mNGS 比 xpert 的敏感度更高, 较少受术前

使用抗生素的影响 [20]。本研究发现部分患者的标本经 mNGS 检测出多种病原体; 而 xpert 只可以检测结核分枝杆菌, 本研究中数例患者 mNGS 检测显示结核分枝杆菌合并化脓菌感染, 仅行抗结核治疗情况下病情逐步恶化, 感染指标持续升高, 抗结核治疗联合对所感染的化脓菌敏感抗生素治疗后好转。本研究中部分 Xpert 和/或病理检查阴性患者依据 mNGS 检测阳性结果诊断脊柱结核, 该部分患者得以早期规范用药不至于疾病进展恶化, 所以虽然 mNGS 检测目前成本高, 但与其带给患者的收益相比, 明显是利大于弊。尤其对于复杂的混合感染, 以及已经行结核菌培养结果阴性, 穿刺 Xpert 结果、病理学检查结果均为阴性的脊柱结核患者, 更是尤为重要。同时本研究还显示 NGS 与 Xpert 检测联合诊断脊柱结核的阳性率为 96.1% (274/285), 说明 NGS 联合 Xpert 技术可以有效的提高诊断率。综上所述, Xpert MTB/RIF 及宏基因组二代测序技术均可作为提高脊柱结核诊断率的有效方法, NGS 技术对比 Xpert 技术有更高的阳性率, 两项技术联合应用可有效提高脊柱结核患者的诊断率。

## 参考文献:

- [1] 刘汉辉, 李辉, 余嘉洪等. 结核感染 T 细胞斑点试验对 脊柱结核的诊断价值 [J]. 中国骨科临床与基础研究杂志, 2017, 9(6): 355-359.
- [2] (Boehm CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [3] 李雪黎, 温海平, 桑俊等. Xpert MTB/RIF 在肺结核及耐药结核检测中的应用价值分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(1): 105-107.
- [4] Gu YT, Wang GR, Dong WJ, et al. Xpert MTB/RIF and Geno-Type MTBDRplus assays for the rapid diagnosis of bone and joint tuberculosis [J]. Int J Infectious Dis, 2015, 36(1): 27-30.
- [5] World Health Organization. Using the Xpert MTB/RIF assay to detect pulmonary and extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults and children: expert group meeting report[S]. Geneva: World Health Organization, 2013.
- [6] Wang G, Dong W, Lan T, et al. Diagnostic accuracy evaluation of the conventional and molecular tests for spinal tuberculosis in a cohort, head-to-head study [J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 1-8.
- [7] (Han DS, Li ZY, Li R, et al. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity [J]. Crit Rev Microbiol, 2019, 45(5/6): 668-685.
- [8] (Gu W, Deng XD, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids [J]. Nat Med, 2021, 27(1): 115-124.
- [9] (Ma CY, Wu HB, Chen G, et al. The potential of metagenomic next-generation sequencing in diagnosis of spinal infection: a retrospective study [J]. Eur Spine J, 2022, 31(2): 442-447.
- [10] Xu JC, Li ZY, Chen XN, et al. More significance of TB-IGRA except for the diagnose of tuberculosis [J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(1): 1-8.
- [11] 崔海燕, 胡媛媛, 马俊等. 轻型脊柱结核药物治疗 149 例临床分析 [J]. 脊柱外科杂志, 2018, 16(4): 218-221.
- [12] 马俊, 肖和平, 尹洪云. 332 例骨关节结核的临床特点分析 [J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(2): 129-132.
- [13] Delogu G, Zumbo A, Fadda G. Microbiological and immunological diagnosis of tuberculous spondylodiscitis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012, 16(Suppl 2): 73-78.
- [14] Walters E, van der Zalm MM, Palmer M, et al. Xpert MTB/RIF on stool is useful for the rapid diagnosis of tuberculosis in young children with severe pulmonary disease [J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(9): 837-843.
- [15] 景辉. 半巢式全自动实时荧光定量 PCR 检测在诊断肺内及肺外结核应用价值研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [16] 李祯. Xpert MTB/RIF 检测骨关节结核病灶中结核分枝杆菌及利福平耐药性的研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- [17] Wang G, Dong W, Lan T, et al. Diagnostic accuracy evaluation of the conventional and molecular tests for Spinal tuberculosis in a cohort, head-to-head study [J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 109.
- [18] 金阳辉, 石仕元, 郑琦等. Xpert MTB/RIF 在脊柱结核诊断及利福平耐药检测中的应用价值 [J]. 中国骨伤, 2017, 30(9): 787-791.
- [19] Tang L, Feng S, Gao R, et al. A comparative study on the role of Xpert MTB/RIF in testing different types of spinal tuberculosis tissue specimens [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2017, 21(12): 722-726.
- [20] Miao Q, Ma YY, Wang QQ, et al. Microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing when applied to clinical practice [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(suppl\_2): S231-S240.

基金项目: 2018 年 12 月山东省医药卫生科技发展计划《Xpert MTB/RIF 在骨关节结核快速诊断中的应用》, 项目编号: 2018WS244, 主持人: 张强。