

Xpert MTB/RIF 检测技术诊断结核病及其耐药的研究*

刘 涛, 杨翌翔, 刘 军, 娄晓丽, 戴婉琴, 高 悦, 侯彦强[△]

(上海市松江区中心医院检验科 201600)

摘要:目的 探讨多色巢式实时荧光定量核酸扩增(Xpert MTB/RIF)检测技术在初诊疑似肺结核患者中的诊断价值及其耐药性。方法 收集 2015 年 1—6 月在上海市松江区中心医院就诊的初诊疑似肺结核患者 430 例,对其痰标本同时进行痰涂片抗酸染色、MGIT 960 液体分枝杆菌培养和 Xpert MTB/RIF 检测,比较 3 种方法诊断结核病的阳性率和符合度。同期将其中 91 例液体培养阳性的标本送至上海市疾病预防控制中心(CDC)进行分枝杆菌菌群鉴定(PNB 法、TCH 法和 28 °C 培养试验)和一线抗结核药物(异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇)的敏感性试验(传统比例法),以上海市 CDC 鉴定结果为标准,分析 Xpert MTB/RIF 检测方法的敏感度、特异度和准确度及其耐药性。结果 430 例患者中,痰涂片抗酸染色、液体培养和 Xpert MTB/RIF 3 种检测方法的分枝杆菌检出率分别为 14.19%、26.74%、22.79%。Xpert MTB/RIF 检测法与液体培养法的符合率为 89.53%(385/430),与涂片法的符合率为 90.93%(391/430)。91 例液体培养阳性患者,经上海市 CDC 菌群鉴定,84 例为结核分枝杆菌复合群(MTC),7 例为非结核分枝杆菌,Xpert MTB/RIF 检测方法的敏感度为 77.38%(65/84),特异度为 100.00%(7/7),准确度为 79.12%(72/91)。Xpert MTB/RIF 检测出的 4 例利福平耐药患者和 61 例利福平敏感患者与比例法药敏鉴定结果完全一致。结论 Xpert MTB/RIF 检测方法阳性率明显高于涂片法,与传统液体培养法有较好的一致性。该方法具有较高的敏感度、特异度和准确度。

关键词:多色巢式实时荧光定量核酸扩增; 结核分枝杆菌; 药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.13.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)13-1898-03

The research of Xpert MTB/RIF assay in the diagnosis and drug resistance of mycobacterium tuberculosis*

LIU Tao, YANG Yixiang, LIU Jun, LOU Xiaoli, DAI Wanqin, GAO Yue, HOU Yanqiang[△]

(Department of Laboratory, Songjiang Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201600, China)

Abstract: Objective To discuss the diagnostic value and drug resistance situation of Xpert MTB/RIF analysis method in initially mycobacterium tuberculosis suspected Patients. Methods 430 examples of initially tuberculosis suspected patients were collected in Songjiang Central Hospital from January to June in 2015. The sputum specimens were tested by acid-fast stain, MGIT 960 liquid culture and Xpert MTB/RIF method at the same time. The positive differences and correspondences were analyzed among the three tests. Meanwhile, the 91 positive sputum specimens in liquid culture were transmitted to the CDC in Shanghai to make bacteria identification and drug sensitivity tests. The sensitivity, specificity, accuracy and drug resistance situation of Xpert MTB/RIF test in tuberculosis patients were analyzed. Results The tuberculosis positive rates of 430 examples were respectively 14.19%, 26.74%, 22.79% through the three methods above. The correspondence rate between Xpert MTB/RIF and liquid culture was 89.53% (385/430). While The correspondence rate between Xpert MTB/RIF and acid-fast stain was 90.93% (391/430). There were 84 mycobacterium complex examples and 7 nonmycobacterium complex examples among the 91 positive sputum specimens in liquid culture. The sensitivity, specificity and accuracy of Xpert MTB/RIF test in tuberculosis patients were 77.38% (65/84), 100.00% (7/7), 79.12% (72/91). The results between Xpert MTB/RIF and proportional methods in 4 rifampicin resistance and 61 rifampicin sensitivity patients were fully consistent. Conclusion The positive rate is higher using Xpert MTB/RIF method than acid-fast stain assay, but in a good consistence with liquid culture method. In all, it is more sensitivity, specificity and accuracy of Xpert MTB/RIF test which can quickly and efficiently diagnose and find the drug resistance situation for tuberculosis patients.

Key words: XPERT; tuberculosis; diagnosis; drug resistance

结核病是严重危害人类身心健康的重大呼吸道传染病之一。目前,我国每年结核病发病数约为 130 万例,占全球的 14%,位居全球第 2 位,是全球 22 个结核病高负担国家之一。近年来,随着分子生物学诊断技术的不断发展,多色巢式实时荧光定量核酸扩增(Xpert MTB/RIF)检测技术受到关注并在多个国家和地区进行了验证评估。Xpert MTB/RIF 检测技术是一种 PCR 体外诊断技术,通过核酸提取、扩增和检测,将前处理后的待检标本放入密闭的反应盒中,通过上述三位一体操作程序自动检出痰标本是否菌阳、带菌量多少,以及是否利福

平耐药,而传统的鉴定和药敏试验需要 3 个月左右的时间^[1]。该院作为结核病防治定点医院参与了全球基金结核病项目,配备了较为完善的 GeneXpert 检测系统,现将近来开展的 Xpert MTB/RIF 检测技术诊断结核病及其耐药性进行探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1—6 月在上海交通大学附属第一人民医院松江分院肺结核门诊初诊的疑似肺结核患者 430 例,男 293 例,年龄 16~88 岁,中位年龄 44 岁,女 137 例,年龄 12~84 岁,中位年龄 43 岁。根据原卫生部发布的《肺结核诊

* 基金项目:上海市松江区科学技术攻关项目。

作者简介:刘涛,男,主管技师,主要从事结核病的实验室诊断研究。△ 通信作者,E-mail:hoyanqiang@aliyun.com。

断标准(W S288-2008)》的临床症状、体征及胸部影像学检查等确诊^[2]。

1.2 仪器与试剂 抗酸染色液购自珠海 BASO 生物技术有限公司,液体分枝杆菌培养基、培养添加剂及消化液均为美国 BD 公司生产,Xpert MTB/RIF 核酸检测试剂由美国 Cepheid 公司生产,以上试剂均由上海市疾病预防控制中心(CDC)提供。液体分枝杆菌快速全自动培养仪为美国 BD BACTEC MGIT 960,利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测采用美国 Cepheid 公司 GeneXpert 检测系统,离心机型号为 Heal Force Neofuge 1600。

1.3 方法

1.3.1 涂片抗酸染色法 患者留取即时痰、夜间痰、次日晨痰共 3 次,涂片抗酸染色操作和质控方法参照《结核病诊断实验室检验规程》^[3]。

1.3.2 液体培养法 无菌取痰标本 2 mL,加入事先准备好的 1~2 倍体积的 2% N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH(NALC-NaOH)标本前处理液,强力漩涡振荡 20 s 后室温静置 15~20 min。然后加入 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS)至 50 mL,3 000×g 离心 15 min 后,再弃上清液,沉淀中加入 1 mL 的 pH 6.8 的 PBS 制备成悬浊液,处理后标本取 0.5 mL 接种至 MGIT 培养管进行液体培养,接种完成后的培养管上机检测。标本接种前,在 MGIT 7 mL 培养管中事先加入 0.8 mL 以生长添加剂溶解后的杂菌抑制剂(PANTA)。

1.3.3 Xpert MTB/RIF 检测法 取 1 mL 痰标本置入有螺旋盖的前处理管中,优先选取痰标本中的黏稠或脓性部分。在前处理管中加入相当于痰标本 2 倍体积的痰标本处理液,旋紧前处理管螺旋盖。在生物安全柜内,将前处理管置于涡旋振荡器上涡旋震荡至少 10 s,直至无可见块状痰标本存在。再将前处理管在室温静置 15 min,使痰标本充分液化,静置 10 min 左右时应注意观察标本,若发现细小块状未液化痰标本,应重复震荡使其溶解。打开 Cartridge 反应盒,使用试剂盒内提供的专用无菌吸管,取 2 mL 处理后样品由加样孔缓慢加入 Cartridge 反应盒内,置于 GeneXpert 检测系统进行全自动检测,约 2 h 即可在检测软件窗口直接读取结果。

1.3.4 药敏试验 将液体培养阳性并经抗酸染色镜检确认为抗酸杆菌的标本送至上海市 CDC 进行分枝杆菌菌群鉴定(PNB 法、TCH 法、28 °C 培养试验)和一线抗结核药物(异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇)的敏感性试验(传统比例法),鉴定方法按照《结核病诊断实验室检验规程》和 WHO/U-NION《结核病耐药监测指南》^[3-5]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分比表示,组间比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种方法检测结核分枝杆菌结果比较 涂片法检测出阳性 61 例,液体培养为 115 例,Xpert MTB/RIF 检测出 98 例。液体培养阳性的 115 例患者中,Xpert MTB/RIF 检出阳性 84 例;液体培养阴性的 315 例患者中,Xpert MTB/RIF 检出阴性 301 例。Xpert MTB/RIF 与液体培养的符合率为 89.53% (385/430)。61 例涂片检测阳性的患者中,Xpert MTB/RIF 检出阳性 60 例;369 例涂片检测阴性的患者中,Xpert MTB/RIF 检出阴性 331 例。Xpert MTB/RIF 与涂片法的符合率为 90.93% (391/430)。见表 1、2。

2.2 菌群鉴定和药敏试验 结核分枝杆菌复合群(MTC)84 例,非结核分枝杆菌(NTM)7 例。Xpert MTB/RIF 检测结核

分枝杆菌的敏感度为 77.38% (65/84),特异度为 100.00% (7/7),准确度为 79.12% (72/91)。MTC 患者存在不同程度的耐药性,占 16.67% (14/84),其中 Xpert MTB/RIF 检测阳性且耐利福平患者 4 例,Xpert MTB/RIF 检测阳性且利福平敏感患者 61 例,7 例 NTM 患者均存在不同程度的耐药。见表 3、4。

表 1 3 种方法检测痰标本结核分枝杆菌的结果比较(n)

| 检测方法 | 阳性(n) | 阴性(n) | 合计(n) | 阳性率(%) |
|---------------|-------|-------|-------|----------------|
| 涂片法 | 61 | 369 | 430 | 14.19* |
| 液体培养法 | 115 | 315 | 430 | 26.74 |
| Xpert MTB/RIF | 98 | 332 | 430 | 22.79 Δ |

注:与涂片法比较, $\chi^2 = 10.563, \Delta P = 0.002$;与液体培养法比较, $\chi^2 = 1.803, * P = 0.206$

表 2 3 种检测方法的准确度结果比较(n)

| Xpert MTB/RIF | 液体培养法 | | 涂片法 | | 合计 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | 阳性(+) | 阴性(-) | 阳性(+) | 阴性(-) | |
| 阳性(+) | 84 | 14 | 60 | 38 | 98 |
| 阴性(-) | 31 | 301 | 1 | 331 | 332 |
| 合计 | 115 | 315 | 61 | 369 | 430 |

表 3 Xpert MTB/RIF 与菌群鉴定结果(n)

| Xpert MTB/RIF | 菌群鉴定 | | 合计 |
|---------------|------|-----|----|
| | MTC | NTM | |
| 阳性(+) | 65 | 0 | 65 |
| 阴性(-) | 19 | 7 | 26 |
| 合计 | 84 | 7 | 91 |

表 4 液体培养法阳性标本药敏检测结果(n)

| 耐药鉴定类型 | 菌群鉴定结果 | | | 合计 |
|--------|---------|---------|---------|----|
| | MTC+ | MTC+ | NTM+ | |
| | XPRT 阳性 | XPRT 阴性 | XPRT 阴性 | |
| 单耐药 | 7 | 3 | 0 | 10 |
| 多耐药 | 1 | 0 | 4 | 5 |
| 耐多药 | 1 | 2 | 3 | 6 |
| 全敏感 | 56 | 14 | 0 | 70 |
| 合计 | 65 | 19 | 7 | 91 |

注:无 NTM+XPRT 阳性病例。单耐药表示对 4 种药物中的任意一种耐药;多耐药表示对其中任意 2 种药物耐药,但不同时耐异烟肼和利福平;耐多药表示至少同时耐异烟肼和利福平

3 讨 论

430 例患者 3 种方法分枝杆菌检测方法显示,Xpert MTB/RIF 检测法在初诊疑似肺结核患者中阳性检出率为 22.79%,明显高于涂片法(14.19%),与液体培养法阳性率有较高的一致性($P > 0.05$),与邹远妮等^[6]研究结论一致。李妍等^[7]对 191 例确诊肺结核患者的痰标本研究发现,Xpert MTB/RIF 技术阳性检出率为 53.90% (103/191),高于抗酸染色的 33.00% (63/191)和培养法的 37.2% (71/191),而抗酸染色和培养法之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究与李妍等^[7]研究结论不一致,3 种方法的阳性检出率均较低,可能与选取的对象是疑似肺结核患者而非临床确诊相关。本研究结果表明,

Xpert MTB/RIF 与涂片法的符合率为 90.93% (391/430), 其中 1 例 Xpert MTB/RIF 检测阴性而涂片阳性的病例经上海市 CDC 菌群鉴定为非结核分枝杆菌; 38 例 Xpert MTB/RIF 检测阳性而涂片阴性可能与痰涂片抗酸染色阳性率低有关, 涂片抗酸染色要求每毫升痰标本中抗酸杆菌数至少大于 5 000 条才能得到阳性结果, Xpert MTB/RIF 法只需要标本中有极其微量的抗酸杆菌就能检测^[8]。Xpert MTB/RIF 与液体培养的符合率为 89.53% (385/430), 以液体培养为标准, Xpert MTB/RIF 的敏感度为 73.04% (84/115), 特异度为 95.56% (301/315)。Xpert MTB/RIF 阳性液体培养阴性 14 例, 可能是核酸检测出现假阳性, 也可能因为 Xpert MTB/RIF 检测结果阳性不表示有生命力的结核分枝杆菌存在, 说明有结核分枝杆菌 DNA 存在的可能, 液体培养阳性的前提是标本中必须存在具有生命力的结核分枝杆菌^[9]。Xpert MTB/RIF 检测阴性液体培养阳性 31 例, 可能原因: (1) 不同检测方法标本的取样不同, 如不是同一口痰。(2) Xpert MTB/RIF 检测时标本量不足、标本为唾液等不合格标本^[10]。(3) 患者感染的分枝杆菌不是结核分枝杆菌复合群, 故 Xpert MTB/RIF 检测不出。(4) Xpert MTB/RIF 是通过检测 *rpoB* 基因片段核心突变区来诊断耐利福平结核病, 虽然耐利福平分枝杆菌的耐药基因多集中在 81bp 的核心突变区, 但在我国不同的地域人群中利福平耐药菌株的 *rpoB* 基因的突变频率不相同^[11]。

同期经上海市 CDC 进行菌群鉴定和药敏检测的 91 例液体培养标本中, 84 例为 MTC, 其中 Xpert MTB/RIF 检测出阳性 65 例, 敏感度为 77.38% (65/84), 较 Chang 等^[12] 90.40% 的敏感度略低。7 例 NTM 经 Xpert MTB/RIF 检测均为阴性, Xpert MTB/RIF 的特异度为 100.00% (7/7), 与 Helb 等^[13] 对 20 例不同的 NTM 进行 Xpert MTB/RIF 检测 100.00% 的特异度结果一致。Xpert MTB/RIF 技术利用实时荧光定量核酸检测技术检测结核分枝杆菌的同时检测利福平是否耐药, 利福平作为重要的抗结核药物耐药现象较为严重。本研究 MTC 患者中存在不同程度耐药的比例为 16.67% (14/84), 65 例 Xpert MTB/RIF 阳性的 MTC 患者使用 Xpert MTB/RIF 检测出耐利福平患者 4 例, 与比例法药敏结果完全一致; 7 例 NTM 患者均存在不同程度耐药且至少耐 2 种以上药物。王怡心等^[14] 对 648 例患者同时进行 Xpert MTB/RIF 和比例法利福平耐药检测, 结果显示 Xpert MTB/RIF 对利福平耐药性检测的敏感度为 86.81% (79/91), 特异度为 95.33% (531/557)。赵永等^[15] 对 119 株结核分枝杆菌进行药敏试验结果显示, Xpert MTB/RIF 对利福平耐药性检测的敏感度为 97.47% (77/79), 特异度为 100.00% (40/40)。由于本研究耐药患者较少, 在此不进行 Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的敏感度和特异度分析, Xpert MTB/RIF 对利福平耐药性的分析尤其在 MDR-TB 患者中的应用分析将成为未来研究的方向。

WHO 强调遏制结核病的主要方法是普及高效和以人为基本的检测诊断技术, 而快速检测和可靠的耐药性测试是先决条件^[16]。虽然 Xpert MTB/RIF 检测技术所需设备和检测价格昂贵, 不能区分结核分枝杆菌是否具有生命力, 在耐药性检测方面只能检测利福平而不能检测异烟肼等药物, 对耐药患者的诊断具有一定局限性。但是, Xpert MTB/RIF 检测技术简单易学, 只需 2 h 左右就可自动获得检验结果, 整个检测过程在密闭环境进行, 避免了标本的污染和交叉感染。作为较高敏感度、特异度且直接、可靠的快速检测方法, Xpert MTB/RIF 检测技术已于 2010 年被 WHO 推荐为诊断结核病的方法之一, 尤其被推荐为耐药性结核病和结核病与艾滋病联合感染的

首选筛查方法。

综上所述, 本研究证实 Xpert MTB/RIF 检测技术作为一种新的检测手段, 能帮助临床较早发现结核患者及其耐药情况, 进行早期结核病的诊断、治疗和管理, 具有较高的临床应用价值和前景。

参考文献

- [1] 尹青琴, 申阿东. Xpert MTB/RIF 试验在结核病诊断中的研究现状[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(5): 363-365.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 肺结核诊断标准[S]. WS288-2008, 2008.
- [3] 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[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 845.
- [4] 李静, 张阳奕, 武洁, 等. 2007~2012 年上海市结核病耐药趋势分析[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(1): 25-30.
- [5] World Health Organization. WHO/IUATLD global working group on antituberculosis drug resistance surveillance [Z]. 1997: 216.
- [6] 邹远妮, 刘尚武, 朱蕾, 等. Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及其耐药性在结核病辅助诊断中的临床价值[J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(3): 568-570.
- [7] 李妍, 张天华, 鲜小萍, 等. Xpert MTB/RIF 技术在 MTB 检测中的应用价值[J]. 检验医学, 2016, 31(1): 52-55.
- [8] 徐大叶. 某结核病定点医院痰涂片阳性率低的调查及应对措施[J]. 医学动物防制, 2014, 10(10): 1177-1178.
- [9] 王志辉. 结核病临床诊治进展年度报告(2012 年)(第一部分结核病临床诊断)[J]. 中国防痨杂志, 2013, 18(6): 405-426.
- [10] Durovni B, Saraceni V, Cordeiro-Santos MA, et al. Operational lessons drawn from pilot implementation of Xpert MTB/Rif in Brazil[J]. Bull World Health Organ, 2014, 92(8): 613-617.
- [11] 李辉, 马晓光, 石洁, 等. 线性探针法 MTBDRplus 用于涂阳肺结核的耐药药检测研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 20(2): 380-383.
- [12] Chang K, Lu W, Wang J, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis[J]. J Infect, 2012, 64(6): 580-588.
- [13] Helb D, Jane M, Story E, et al. Rapid detection of mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology[J]. Clin Microbiol, 2010, 48(1): 229-237.
- [14] 王怡心, 陈雄豪, 林惠玲, 等. Xpert MTB/RIF 技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(3): 176-179.
- [15] 赵永, 梁庆福, 林淑芳, 等. Xpert MTB/RIF 检测技术用于耐药药结核分枝杆菌利福平耐药检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(15): 2621-2622.
- [16] Ravigione MC. The global plan to stop TB, 2006-2015 [J]. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2006, 10(3): 238-239.