

· 论著 ·

GeneXpert MTB/RIF 技术在结核病早诊断中的应用

路丽萍 陆斌 刘梅 洪建军 郭晓芹 高谦

【摘要】目的 评估 GeneXpert MTB/RIF 技术(简称 Xpert MTB/RIF)检测结核分枝杆菌(MTB)及其利福平耐药的可行性。**方法** 选取 2015 年 1—6 月上海市松江区结核病定点医院结核科门诊连续纳入、初次就诊的疑似结核病患者,共 556 例。收集患者痰液标本,分别进行涂片抗酸染色镜检法(简称“涂片法”)、液体分枝杆菌培养管(MGIT)培养法(简称“液体培养法”)、传统比例法药物敏感性试验(简称“药敏试验”)和 Xpert MTB/RIF 检测,比较 Xpert MTB/RIF 法和传统方法检测痰标本中 MTB 及其耐药性的效能。**结果** 537 例患者经涂片法、液体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测,阳性率分别为 17.32%(93/537)、28.31%(152/537) 和 28.12%(151/537)。以液体培养为金标准,Xpert MTB/RIF 检测的敏感度和特异度分别为 90.60%(135/149) 和 95.84%(369/385),且敏感度高于涂片法[涂片法的敏感度为 60.53%(92/152)],差异有统计学意义($\chi^2=36.71, P<0.01$);Xpert MTB/RIF 检测涂阳标本的敏感度为 96.63%(86/89),明显高于检测涂阴标本的敏感度[81.67%(49/60)],差异有统计学意义($\chi^2=9.43, P<0.01$)。以比例法药敏试验结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的敏感度为 90.00%(9/10),特异度为 99.07%(106/107),一致率为 98.29%(115/117)。**结论** Xpert MTB/RIF 技术操作简便、快速、安全,敏感度和特异度较高,对基层实验室早期检测 MTB 及判定利福平耐药具有重要价值。

【关键词】 分枝杆菌,结核; 痰; 核酸扩增技术; 早期诊断; 利福平; 抗药性

Application of GeneXpert MTB/RIF test for early diagnosis of tuberculosis LU Li-ping*, LU Bin, LIU Mei, HONG Jian-jun, GUO Xiao-qin, GAO Qian. * Department of Tuberculosis Control, Songjiang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201620, China
Corresponding author: LU Li-ping, Email: luluyer-1194@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the application of GeneXpert MTB/RIF in detecting tuberculosis and resistance to rifampin. **Methods** Sputum samples from 556 continuous patients with suspected tuberculosis from Clinics in Songjiang Central Hospital between January, 2015 and June in, 2015 were collected. The sensitivity and specificity of different were detected by smear test, liquid culture, traditional proportion method drug susceptibility test, and GeneXpert MTB/RIF test, the detection rates of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and rifampin resistances of traditional methods and GeneXpert MTB/RIF were analyzed. **Results** The positive rates of bacteria smear, liquid culture, and GeneXpert MTB/RIF method used for 537 sputum samples were 17.32% (93/537), 28.31% (152/537) and 28.12% (151/537). Compared to the liquid culture result (the golden standard), the sensitivity and specificity of the GeneXpert MTB/RIF for MTB were 90.60% (135/149) and 95.84% (369/385), the sensitivity was significantly higher than that of smear microscopy (60.53% (92/152); $\chi^2=36.71, P<0.01$). The sensitivities of GeneXpert MTB/RIF test for sputum smear-positive and smear-negative were significantly different (96.63% (86/89) vs. 81.67% (49/60), $\chi^2=9.43, P<0.01$). According to the result of conventional drug susceptibility with proportion method, the sensitivity, specificity and consistent rates of GeneXpert MTB/RIF test in detecting rifampin resistance were 90.00% (9/10), 99.07% (106/107) and 98.29% (115/117), respectively. **Conclusion** GeneXpert MTB/RIF method is simple, rapid, and with high safety, sensitivity and specificity, therefore, it has great value in the early diagnosis of tuberculosis and determination of rifampin resistance in primary laboratories.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Sputum; Nucleic acid amplification techniques; Early diagnosis; Rifampin; Drug resistance

目前,国内结核病实验室检测结核分枝杆菌(MTB)的常用方法仍然是痰涂片抗酸染色镜检、罗氏固体培养和比例法药物敏感性试验(简称“药敏试验”)。涂片镜检法的阳性检出率低,传统固体培养和药敏试验耗时较长,均难以实现对结核病患者的早期正确诊断和治疗^[1]。随着分子生物学诊断技术的不断发展,GeneXpert MTB/RIF技术(简称Xpert MTB/RIF)作为一种利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术,受到了国内外的广泛关注。该检测方法针对MTB *ropB*基因81 bp利福平耐药区间设计引物和探针,检测其是否发生突变。其完全整合传统核酸扩增所需的3个主要步骤(核酸提取、扩增和检测),仅需将处理后的待检样品放入反应盒后,系统就会自动进行核酸提取、被提取物核酸扩增和产物检测,反应结束后会自动给出实验结果。Xpert MTB/RIF检测技术操作简单、方便,2.5 h之内即可诊断患者是否感染MTB及其是否对利福平耐药^[2-4],而传统方法检测利福平耐药则需要8周。

依托“十二五”国家科技重大专项支持,上海市松江区对2015年1—6月在该区唯一的结核病定点医院(上海市松江区中心医院)结核科门诊就诊的疑似肺结核患者进行连续6个月监测,对痰液样本同时进行涂片抗酸染色镜检法(简称“涂片法”)、液体分枝杆菌培养管(MGIT)培养法(简称“液体培养法”)、传统比例法药敏试验和Xpert MTB/RIF检测,以评估Xpert MTB/RIF在检测MTB及其是否对利福平耐药方面的应用效能,现报告如下。

对象和方法

一、研究对象

选取2015年1—6月上海市松江区中心医院结核科门诊连续纳入的初次就诊的疑似结核病患者,共556例,收集其痰液标本。

二、试验方法

1. 仪器与试剂:GeneXpert检测系统及其配套试剂盒(Cartrige反应盒)购自美国Cepheid公司;痰标本处理液购自美国Cepheid公司;BACTEC MGIT 960系统及其配套试剂(MGIT生长指示管、分枝杆菌培养添加剂试剂盒、分枝杆菌联合药敏试剂盒系列)购自美国BD公司;改良罗氏培养基及噻吩-2-羧酸酰肼、对硝基苯甲酸鉴别培养基由上海市疾病预防控制中心培养基室配制;萋-尼抗酸染液购自珠海贝索生物技术有限公司;其他部分试剂为国产分析纯。

2. 痰涂片检查:按照《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[5]中的标准化操作程序执行。

3. 液体培养:采用BACTEC MGIT 960培养系统进行液体培养,参照《结核病诊断实验室检验规程》^[6]操作及美国BD医疗器械(上海)有限公司提供的《MGIT液体培养操作手册》进行标准化操作。取处理好的痰液标本0.5 ml,加入MGIT液体培养管中,放入BACTEC MGIT 960液体培养系统中进行培养;培养阳性的标本进一步行药敏试验。

4. 传统生化法菌种鉴别:参照《结核病诊断实验室检验规程》^[6]操作。根据阳性生长对照孔、噻吩-2-羧酸酰肼药物孔、对硝基苯甲酸药物孔生长快慢,以及阳性和阴性情况判定鉴定结果。生长缓慢,噻吩-2-羧酸酰肼药物孔阳性,对硝基苯甲酸药物孔阴性者鉴定为MTB。

5. 药敏试验:参照《结核病诊断实验室检验规程》^[6]操作,采用文献^[7]推荐的比例法,应用罗-琴(L-J)培养基,利福平40.0 μg/ml。耐药判定:根据菌落在培养基上生长情况,若含药培养基上生长的菌落数与对照培养基上生长菌落数的百分比大于1%,则认为受试菌对该抗结核药物耐药。

6. Xpert MTB/RIF检测:按照Xpert MTB/RIF操作说明书进行。移取1.0 ml痰液至螺旋盖试管中并加入2.0 ml痰标本处理液,在涡旋振荡器上振荡10 s,室温放置15 min,用专用吸管转移样本至专用的样本反应盒,将样本反应盒放入Xpert MTB/RIF Dx仪器的样本舱中,进行DNA提取、PCR扩增和结果的检测,通过专用软件判读结果。

7. 质量控制:结核病痰检实验室操作人员均参加了国家Xpert MTB/RIF检测方法和仪器操作的专门培训,同时均参加每年国家结核病实验室药敏检测熟练度测试。

三、统计学分析

采用Excel 2007软件收集试验数据,应用SPSS 17.0软件进行统计学分析。不同检测方法间敏感度、特异度、一致率的比较采用 χ^2 检验,以P<0.05为差异有统计学意义。敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%;一致率=(真阳性例数+真阴性例数)/总例数×100%。

结 果

一、基本情况

对纳入的556例患者痰标本分别进行了痰涂

片、液体培养及 Xpert MTB/RIF 检测,其中 13 例患者的标本培养污染,4 例 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 失败,2 例 Xpert MTB/RIF 利福平耐药检测结果无法判读,最终纳入分析 537 例。

二、各方法检测 MTB 的比较

1. 细菌学检测结果:537 例患者痰标本中,涂片法检查阳性 93 例(17.32%),阴性 444 例(82.68%);液体培养阳性 152 例(28.31%),阴性 385 例(71.69%);Xpert MTB/RIF 检测阳性 151 例(28.12%),阴性 386 例(71.88%)。152 例液体培养阳性的患者经菌种鉴定为 MTB 感染者 149 例,非结核分枝杆菌感染者 3 例。

2. 涂片法与 Xpert MTB/RIF 检测结果的比较:93 例涂片检查阳性患者经 Xpert MTB/RIF 检测有 86 例阳性;444 例涂片检查阴性患者经 Xpert MTB/RIF 检测有 379 例阴性。相对于涂片检查,Xpert MTB/RIF 检测的敏感度为 92.47%(86/93),特异度为 85.36%(379/444)。

3. 液体培养法与 Xpert MTB/RIF 检测结果的比较:149 例液体培养阳性的患者中(不包括鉴定为非结核分枝杆菌 3 例),经 Xpert MTB/RIF 检测有 135 例阳性;液体培养阴性的 385 例患者中,Xpert MTB/RIF 检测有 369 例阴性。相对于液体培养,Xpert MTB/RIF 检测敏感度为 90.60%(135/149),

特异度为 95.84%(369/385)。

4. 以液体培养为金标准比较涂片法和 Xpert MTB/RIF 检测的效能:涂片法和 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 的敏感度分别为 60.53% 和 90.60%,Xpert MTB/RIF 检测敏感度高于涂片法,差异有统计学意义($\chi^2=36.71, P<0.01$)。涂片法和 Xpert MTB/RIF 检测的一致率分别为 88.64% 和 93.85%,Xpert MTB/RIF 检测高于涂片法,差异有统计学意义($\chi^2=11.35, P=0.010$)。具体见表 1。

5. Xpert MTB/RIF 检测涂阳及涂阴痰标本的效能:涂片检查阴性的 444 例患者,液体培养阳性者 60 例,Xpert MTB/RIF 检测阳性 49 例,均为 MTB。以液体培养结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测涂阴患者的敏感度为 81.67%(49/60),特异度为 95.83%(368/384)。涂片检查阳性的 93 例患者,液体培养阳性 92 例,其中 3 例经鉴定是非结核分枝杆菌,这 3 例 Xpert MTB/RIF 结果为 MTB(未检测出)。除去 3 例非结核分枝杆菌,其余 90 例结果见表 2。以液体培养结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测涂阳患者的敏感度和特异度分别为 96.63%(86/89)和 1/1。Xpert MTB/RIF 检测涂阳标本的敏感度高于涂阴标本,差异有统计学意义($\chi^2=9.43, P<0.01$)。

表 1 以液体培养为金标准比较涂片法和 Xpert MTB/RIF 检测痰液标本的效能

检测方法	液体培养		敏感度(%)	特异度(%)	一致率(%)
	阳性(例)	阴性(例)			
涂片法			60.53	99.74	88.64
阳性	92	1			
阴性	60	384			
Xpert MTB/RIF			90.60	95.84	93.85
阳性	135	16			
阴性	14	369			

表 2 以液体培养结果为金标准比较 Xpert MTB/RIF 检测涂片阳性与阴性痰标本的效能

Xpert MTB/RIF	液体培养			敏感度 (%)	特异度 (%)	一致率 (%)
	阳性(例)	阴性(例)	合计(例)			
涂阴患者				81.67	95.83	93.92
阳性	49	16	65			
阴性	11	368	379			
涂阳患者				96.63	1/1	96.67
阳性	86	0	86			
阴性	3	1	4			

表3 Xpert MTB/RIF与比例法药敏试验检测培阳患者对利福平耐药性的结果比较

Xpert MTB/RIF	比例法药敏试验			敏感度(%)	特异度(%)	一致率(%)
	耐药(例)	敏感(例)	合计(例)			
耐药	9	1	10	90.00	99.07	98.29
敏感	1	106	107			
合计	10	107	117			

三、Xpert MTB/RIF与比例法药敏试验检测利福平耐药性的比较

液体培养与 Xpert MTB/RIF 检测结果均为阳性的 135 例患者中,18 例未做传统药敏试验,同时应用 Xpert MTB/RIF 与比例法药敏试验进行利福平耐药检测的患者共 117 例,检测结果见表 3。以比例法药敏试验检测结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 MTB 对利福平耐药的敏感度为 90.00% (9/10),特异度为 99.07% (106/107)。

讨 论

实验室检查是结核病确诊尤其是耐多药结核病确诊的重要依据。目前,我国基层结核病实验室诊断菌阳肺结核仍主要依赖于痰涂片和痰培养等传统方法。但是,这两种方法因其检出率较低,致使部分菌阳肺结核不能被及时发现。因而,探索一种 MTB 高检出率的方法,快速、准确诊断肺结核及其耐药性,对控制结核病疫情具有重要意义。

近年来,Xpert MTB/RIF 检测技术已在多个国家和地区进行了验证评估^[8-11],Xpert MTB/RIF 检测可自动完成从 MTB 的 DNA 提取、扩增、产物检测到结果报告^[15],且除标本前处理外整个检测均在封闭的反应盒内进行,全部检测过程仅需要 2.5 h,能够实现结核病和利福平耐药的快速检测。同时,由于其敏感度和特异度较高,为 WHO 所推荐^[12]。

目前,国内报道的对 Xpert MTB/RIF 检测的评估研究均以固体培养为金标准,液体培养为金标准者少见。上海市松江区结核病实验室 2012 年以来配置了 BACTEC MGIT 960 仪,对患者的痰标本检查全面实施液体培养,取代固体培养。本研究即以液体培养为金标准评估 Xpert MTB/RIF 技术,对国内的相关研究提供了参考价值。

本研究显示,Xpert MTB/RIF 检测与涂片、液体培养法比较,其敏感度分别为 92.47% 和 90.60%,同其他研究报道的结果相近^[3,13]。以液体培养法结果为金标准,涂片法和 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 的敏感度分别为 60.53% 和 90.60%,Xpert MTB/RIF

检测的敏感度明显高于涂片法检查,结果与其他研究相符^[14]。相比液体培养法,Xpert MTB/RIF 检测的报告时间大大缩短,提示 Xpert MTB/RIF 检测的临床应用价值高于传统涂片和液体培养法。目前,结核门诊就诊的具有典型症状或体征的肺结核患者明显减少,影像学表现不典型者亦较多,给临床医生的诊断带来的难度越来越大。Xpert MTB/RIF 检测技术的应用则能更好地辅助临床医生进行诊断,尤其对于菌阴肺结核患者进行早期诊断和治疗。

本研究结果显示,以液体培养法结果为金标准,Xpert MTB/RIF 检测涂阳患者和涂阴患者 MTB 的敏感度分别为 96.63% 和 81.67%,与国内报道的 Xpert MTB/RIF 检测涂阳患者敏感度结果相近^[4,17]。西班牙^[18]、法国^[19]和美国^[20]分别开展的 3 项试验显示,Xpert MTB/RIF 对痰涂片阳性标本的检测敏感度为 98%~100%,对痰涂片阴性标本的检测敏感度为 57%~83%,与本研究结果相近。由此,提示该方法检测痰涂片阳性标本时的敏感度较高,而检测痰涂片阴性标本时的敏感度相对较低^[20-22]。

本研究中,Xpert MTB/RIF 检测 MTB 对利福平耐药的敏感度为 90.00%,特异度为 99.07%。与国内外报道的敏感度相近^[4,13-14]。但由于本研究的对象为初诊的疑似肺结核患者,检测到对利福平耐药的患者例数较少,下一步将扩大样本量进行进一步评估。

综上,Xpert MTB/RIF 是一种快速、简便、自动化的分子诊断方法,敏感度和特异度较高,相对涂片、液体培养法及传统药敏试验等检测技术,其对实验室生物安全要求较低,且对操作人员危害轻,适用于基层实验室早期诊断结核病及是否对利福平耐药。WHO 建议加快 Xpert MTB/RIF 检测技术的推广,作为一种全新的结核病快速诊断工具在临幊上使用^[12,23]。本研究也在某种程度上证明,该方法在我国基层实验室对于结核病诊断及是否对利福平耐药的患者筛查具有一定的意义和应用前景。但 Xpert MTB/RIF 检测技术需要相应的仪器及配套

试剂,价格昂贵,且该方法仅能检测利福平是否耐药,而不能够对异烟肼是否耐药进行检测,不能诊断耐多药结核病,这些都限制了其在我国实验室诊断中的广泛应用。

参 考 文 献

- [1] 王怡心,陈雄豪,林惠玲,等. XpertMTB/RIF 技术在基层实验室结核病诊断中的应用研究. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(3):176-179,192.
- [2] Blakemore R, Story E, Helb D, et al. Evolution of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(7):2495-2501.
- [3] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [4] 刘亚芹,杨振斌,冯冬霞,等. GeneXpert 法检测结核分枝杆菌及其对利福平耐药性的研究. 中华实验和临床感染病杂志, 2015, 9(4):524-527.
- [5] 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:中国协和医科大学出版社,2009.
- [6] 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,2006:34-58.
- [7] World Health Organization. WHO/IUATLD global working group on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 1997:216.
- [8] Kurbatova EV, Kaminski DA, Erokhin VV, et al. Performance of Cepheid® Xpert MTB/RIF® and TB-Biochip® MDR in two regions of Russia with a high prevalence of drug-resistant tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, 32(6): 735-743.
- [9] Myneedu VP, Behera D, Verma AK, et al. Xpert® MTB/RIF assay for tuberculosis diagnosis: evaluation in an Indian setting. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2014, 18(8): 958-960.
- [10] Ou X, Xia H, Li Q, et al. A feasibility study of the Xpert MTB/RIF test at the peripheral level laboratory in China. *Int J Infect Dis*, 2015, 31: 41-46.
- [11] Mokaddas E, Ahmad S, Eldeen HS, et al. Discordance between Xpert MTB/RIF assay and Bactec MGIT 960 Culture System for detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(4): 1351-1354.
- [12] World Health Organization. Rapid implementation of the Xpert MTB/RIF diagnostic test: technical and operational 'HOW to'; practical considerations. Geneva: World Health Organization, 2011.
- [13] 李辉,谭耀驹,李洪敏,等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术的诊断效果对比研究. 中国防痨杂志, 2014, 36(6): 472-476.
- [14] 赵冰,欧喜超,夏辉,等. Xpert Mtb/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用评价. 中国防痨杂志, 2014, 36(6): 462-466.
- [15] Lawn SD, Nicol MP. Xpert® MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance. *Future Microbiol*, 2011, 6(9):1067-1082.
- [16] 胡忠义. 结核病耐药性检测技术进展及存在的问题和对策. 中国防痨杂志, 2013, 35(11):865-867.
- [17] 张治国,欧喜超,孙倩,等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术检测痰标本中结核分枝杆菌及其耐药性的研究. 中国防痨杂志, 2013, 35(1):13-16.
- [18] Moure R, Muñoz L, Torres M, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(3):1137-1139.
- [19] Armand S, Vanhulst P, Delcroix G, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(5):1772-1776.
- [20] Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(4):1621-1623.
- [21] Rachow A, Zumla A, Heinrich N, et al. Rapid and accurate detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by Cepheid Xpert MTB/RIF assay-a clinical validation study. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20458.
- [22] Theron G, Peter J, van Zyl-Smit R, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(1): 132-140.
- [23] World Health Organization. WHO endorses new rapid tuberculosis test [EB/OL]. (2010-12-08) [2016-06-20]. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/tb_test_20101208/en/.

(收稿日期:2016-06-02)

(本文编辑:李敬文)