

## · 论 著 ·

## GeneXpert MTB/RIF 检测在肺结核诊断中的价值评估

牛海军 王歌 李明虎

**【摘要】 目的** 评估 GeneXpert MTB/RIF 检测方法对结核分枝杆菌(MTB)及其利福平耐药性检测的准确性和可行性。**方法** 于 2012 年 11 月至 2015 年 11 月,收集来自河南省南阳市第六人民医院和辖区 11 个县(区)结核病防治机构的 1154 例疑似肺结核患者的痰标本。患者痰标本均于河南省南阳市第六人民医院分别进行涂片镜检、固体培养、比例法药敏试验和 GeneXpert MTB/RIF 检测,分析比较 GeneXpert MTB/RIF 方法与传统方法检测 MTB 及利福平耐药性的检测效能。**结果** 以固体培养结果为金标准, GeneXpert MTB/RIF 方法检测 MTB 的敏感度和特异度分别为 90.0% (522/580) 和 89.5% (418/467); 以传统比例法药敏试验结果为金标准, GeneXpert MTB/RIF 方法检测 MTB 利福平耐药的敏感度和特异度分别为 87.7% (64/73) 和 96.6% (460/476)。**结论** GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 有较高的敏感度和特异度,在肺结核快速早期诊断及利福平耐药性检测方面有较好的应用前景。

**【关键词】** 分枝杆菌, 结核; 核酸扩增技术; 利福平; 抗药性

**Assessment of GeneXpert MTB/RIF test for diagnosis of pulmonary tuberculosis** NIU Hai-jun, WANG Ge, LI Ming-hu. Nanyang Tuberculosis Control Institute, Nanyang 473001, China  
Corresponding author: NIU Hai-jun, Email: 154573539@qq.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the accuracy and feasibility of GeneXpert MTB/RIF test in detecting *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and rifampin resistance. **Methods** From November 2012 to November 2015, the sputum samples of 1154 suspected cases from Nanyang Sixth People's Hospital and tuberculosis control institutions in 11 counties (districts) in Nanyang city, Henan province, were collected. The smear microscopy, solid culture, traditional proportion method of drug susceptibility test and GeneXpert Mtb/RIF test were conducted in Nanyang Sixth People's Hospital. This study aimed to compare the GeneXpert MTB/RIF method and traditional method to detect MTB and rifampicin resistance. **Results** Considering the solid culture method as gold standard, the sensitivity and specificity of GeneXpert MTB/RIF test in detecting MTB were 90% (522/580) and 89.5% (418/467), respectively. Considering the traditional proportion method as gold standard, the sensitivity and specificity of GeneXpert MTB/RIF test in detecting rifampin resistance were 87.7% (64/73) and 96.6% (460/476), respectively. **Conclusion** GeneXpert MTB/RIF detects MTB with high sensitivity and specificity, and has good prospects in early diagnosis of tuberculosis and detection of rifampicin resistance.

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

结核病由结核分枝杆菌(MTB)感染引起,仍然是严重危害人类健康的全球性公共卫生问题。耐药结核病已经成为全球结核病疫情急剧上升的原因之一。一方面,缺乏敏感度高的诊断方法,延误了患者的诊断和治疗;另一方面,作为金标准的 MTB 培养检查方法耗时较长,滞后于临床诊治需要,导致耐药

结核病传播的机会增加。因此,如何快速完成对肺结核特别是涂阴和耐药肺结核的确诊对于结核病的防控具有十分重要的意义。

GeneXpert MTB/RIF 检测技术依据荧光定量 PCR 的原理,针对 MTB 的 *rpoB* 基因 81 bp 利福平耐药核心区间(RRDR)设计引物、探针,检测其是否发生突变,能直接从患者新鲜痰液里同时检测 MTB 及其是否对利福平耐药(*rpoB* 序列存在突变),整个检测时间约为 2 h。国内外研究均表明该方法检测的敏感度和特异度都高于现有的检测方法<sup>[1-3]</sup>,为 MTB 的检出及其利福平耐药性的检测提供了快

速、准确的诊断依据。另外,此项技术整合了传统 PCR 检测所需的步骤,并将其自动化,使得操作简便,适于临床应用。在结核病高发和耐药形势严峻的地区,对于快速诊断耐药结核病、指导临床合理用药, GeneXpert MTB/RIF 检测方法不失为一种有应用价值的检测手段。但该方法在国内应用较晚,目前在县、市级结核病防治机构大规模应用的可行性研究较少。本研究即应用 GeneXpert MTB/RIF 检测河南省南阳市 1154 例疑似肺结核患者的痰标本,并与固体培养和传统比例法药物敏感性试验(简称“药敏试验”)结果进行对比,评估其检测效能,为进一步在基层实验室推广该技术提供参考。

### 资料和方法

1. 对象:于 2012 年 11 月至 2015 年 11 月收集来自河南省南阳市第六人民医院和辖区 11 个县(区)结核病防治机构的 1154 例疑似肺结核患者的痰标本。患者痰标本均于河南省南阳市第六人民医院分别进行涂片镜检、固体培养、比例法药敏试验和 GeneXpert MTB/RIF 检测。

2. 方法:(1)痰涂片:参照《中国结核病防治规划痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》<sup>[4]</sup> 痰萋-尼染色法要求,并按照文献规定的光学显微镜报告标准进行报告。(2)痰培养:参照《结核病诊断实验室检验规程》<sup>[5]</sup> 制备酸性罗氏培养基。采用 4% NaOH 法对涂片后剩余的标本处理 15 min,取 0.1 ml 无菌操作接种于酸性罗氏培养基斜面,放置于 35~37 °C 培养箱中孵育。每周观察结果并及时报告阳性结果,若满 8 周仍未有菌落生长,则报告培养阴性<sup>[5]</sup>。(3)比例法药敏试验:用接种环取培养基上的菌落,研磨后与标准麦氏管比对,制成 1 mg/ml 菌悬液,梯度稀释为  $10^{-2}$  mg/ml 和  $10^{-4}$  mg/ml,接种到含利福平(40  $\mu$ g/ml)的罗氏固体培养基和空白对照管培养基,37 °C 培养 4 周后观察结果<sup>[5]</sup>。(4) *rpoB* 耐药核心区间测序:测序上游引物为 5'-CTTG-CACGAGGGTCAGACCA-3';下游引物为 5'-ATCTCGTCGCGCTAACCACGCC-3'<sup>[6]</sup>,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。(5) GeneXpert MTB/RIF 核酸扩增检测:按照 GeneXpert MTB/RIF (美国 Cepheid 公司)操作说明书上的步骤,取 1 ml 痰标本放置到有螺旋盖的前处理管中,然后加入相当于 2 倍痰标本体积的 GeneXpert 样品试剂(SR),旋紧前处理管,在涡旋振荡器上涡旋振荡 15~30 s,室温静置 15 min,使痰标本充分液化。打开反应盒,

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反应盒,然后将反应盒放置到检测模块,仪器开始自动化检测。反应结束后,在检测系统窗口下可直接观察测试结果。结果的判断依照探针的循环阈值(Ct 值),当内对照探针 Ct 值  $\leq 38$  即为阳性,5 个探针中至少 2 个探针 Ct 值  $\leq 38$  即为检测到 MTB。该方法检测利福平耐药的基础在于 MTB 特异性分子信标早期 Ct 值和晚期 Ct 值之差,即  $\Delta$ Ct 值,当  $\Delta$ Ct  $> 3.5$  时提示对利福平耐药,当  $\Delta$ Ct  $\leq 3.5$  时提示对利福平敏感。

3. 统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计算 GeneXpert MTB/RIF 检测的敏感度和特异度;并对 GeneXpert MTB/RIF 检测与固体培养法进行一致性检验(Kappa 检验),Kappa 值  $\geq 0.75$  认为两者一致性较好。

### 结 果

1. 基本情况:1154 例疑似肺结核患者经检测,涂阳 401 例(34.7%),涂阴 753 例(65.3%);涂阴患者中最后确诊为肺部肿瘤、肺炎、支气管扩张者 41 例。401 例涂阳患者中,20 例 GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 结果为无效,无效率为 5.0%;经实验室查找,涂片阳性级别 1+ 及以下 18 例,2+ 级别 2 例,6 例检测结果为无法判断。753 例涂阴患者中,73 例 GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 结果为无效,8 例检测结果为无法判断。最终可进行 GeneXpert MTB/RIF 对比分析者 1047 例;其中,痰培养阳性 580 例,31 例 GeneXpert MTB/RIF 检测利福平耐药结果无法判断,最终可进行对比分析者 549 例。

2. GeneXpert MTB/RIF 对 MTB 的检测结果:使用 GeneXpert MTB/RIF 检测 1047 例疑似肺结核患者,其中,涂阳 375 例(35.8%),涂阴 672 例(64.2%)。以固体培养结果为金标准, GeneXpert MTB/RIF 检测涂阳患者 MTB 的敏感度为 97.8% (353/361),特异度为 14.3% (2/14);检测涂阴患者 MTB 的敏感度为 77.2% (169/219),特异度为 91.8% (416/453);全部患者检测的敏感度为 90.0% (522/580),特异度为 89.5% (418/467),见表 1。在肺部肿瘤、肺炎、支气管扩张的 41 例非结核患者中,有 2 例 GeneXpert Mtb 检测阳性,特异度为 95.1% (39/41)。对 GeneXpert MTB/RIF 和固体培养进行 Kappa 检验, Kappa 值为 0.815,两者具有较好的一致性。

表 1 GeneXpert MTB/RIF 法对痰标本中 MTB 的检测效能分析(例)

GeneXpert MTB/RIF 检测	涂阳患者			涂阴患者		
	培养阳性	培养阴性	合计	培养阳性	培养阴性	合计
阳性	353	12	365	169	37	206
阴性	8	2	10	50	416	466
合计	361	14	375	219	453	672

表 2 GeneXpert MTB/RIF 法对痰标本中 MTB 利福平耐药情况的检测效能(例)

GeneXpert MTB/RIF 检测	涂阳患者			涂阴患者		
	培养阳性	培养阴性	合计	培养阳性	培养阴性	合计
阳性	49	8	57	15	8	23
阴性	6	290	296	3	170	173
合计	55	298	353	18	178	196

3. GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 耐药性分析:使用 GeneXpert MTB/RIF 方法检测培养阳性 549 例患者痰标本中的 MTB 对利福平的耐药性,其中涂阳 353 例(64.3%),涂阴 196 例(35.7%)。以比例法药敏结果为金标准, GeneXpert MTB/RIF 检测涂阳患者利福平耐药的敏感度为 89.1%(49/55),特异度为 97.3%(290/298);检测涂阴患者利福平耐药的敏感度为 83.3%(15/18),特异度为 95.5%(170/178);检测全部患者的敏感度为 87.7%(64/73),特异度为 96.6%(460/476),见表 2。对 GeneXpert MTB/RIF 和比例法药敏试验进行  $Kappa$  检验,  $Kappa$  值为 0.811,两者具有较好的一致性。

## 讨 论

结核病的早期诊断和耐药性检测对于更好地控制耐药结核病的传播具有十分重要的意义。目前,我国肺结核诊断所依据的实验室检查中,细菌学检查仍是诊断的金标准,主要包括痰涂片和培养 2 种方法。但是,痰涂片直接镜检法阳性率不高,且受痰标本质量的影响较大;而培养方法检测需要 5~8 周时间,明显滞后于临床医师对肺结核早期诊断的期望。此外,传统的药敏试验受到许多因素的影响,并且耗时过长。因此,建立和推广特异度、敏感度高的 MTB 检测和耐药性检测方法至关重要。

GeneXpert MTB/RIF 是近年迅速发展的基因诊断技术,与传统检测方法相比,敏感度和特异度均有明显提高。本研究中, GeneXpert MTB/RIF 对痰标本 MTB 检测的敏感度为 90.0%,特异度为 89.5%;对利福平耐药检测的敏感度为 87.7%,特

异度为 96.6%,与国内文献报道一致<sup>[7]</sup>。此外,由于大部分(约 86%)利福平耐药株同时对异烟肼耐药<sup>[8]</sup>,故在利福平耐药的情况下,一定程度上可作为耐多药结核病的筛查和监测指标。

GeneXpert MTB/RIF 虽然对涂阳培阳的样本阳性检出率较高,但对涂阴培阴的检出率仍不高。本研究中有 107 例患者的传统固体培养和 GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 的结果不一致,经查证,49 例培养阴性而 GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 结果为阳性患者中,29 例为复治肺结核,这主要是由于培养法敏感度低所致,也可能与培养前应用抗结核药物导致标本内 MTB 生长能力下降或形成死菌有关;401 例涂阳患者中,20 例 GeneXpert MTB/RIF 检测 MTB 结果无效,考虑为阳性级别较低标本中 MTB 浓度低所致。上述结果均提示该方法的可靠性依赖于样本中的细菌载量,且与正确的样本采集、处理和存储有关。

总之, GeneXpert MTB/RIF 具有快速、高效的特点,且只需 2 h 即可完成,极大地缩短了检测的时间,有助于对患者尽快确诊并及时采取治疗手段。其作为集 MTB 检测和 MTB 利福平耐药检测为一体的新型检测技术,检测诊断准确率高,应用价值大;作为安全、快速的临床检查手段,对于肺结核的早期诊断和耐药性检测具有积极意义。因此,在结核病高发和耐药形势严峻的地区,对于快速诊断耐药结核病、指导临床合理用药, GeneXpert MTB/RIF 不失为一种有应用价值的检测手段,值得在县、市级结核病防治机构推广应用。

## 参 考 文 献

- [1] 陈子芳, 孙义军, 孙本海. GeneXpert MTB/RIF 系统在肺结

- 核诊断及利福平耐药检测中的应用价值. 中华临床感染病杂志, 2014, 7(4): 351-353.
- [2] 刘亚芹, 杨振斌, 冯东霞, 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(电子版), 2015, 9(4): 524-527.
- [3] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.
- [4] 赵雁林, 刘宇红, 姜广路, 等. 中国结核病防治规划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: 5-13.
- [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: 8-45.
- [6] Malhotra S, Cook VJ, Wolfe JN, et al. A mutation in *Mycobacterium tuberculosis rpoB* gene confers rifampin resistance in three HIV-TB cases. Tuberculosis (Edinb), 2010, 90(2): 152-157.
- [7] 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.
- [8] 尹青琴, 申阿东. Xpert MTB/RIF 试验在结核病诊断中的研究现状. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(5): 363-365.
- (收稿日期: 2017-05-15)  
(本文编辑: 李敬文)

## · 文献速览 ·

### 血糖控制与发生结核病的风险: 一项队列研究

Lee PH, Fu H, Lai TC, et al. Glycemic control and the risk of tuberculosis: a cohort study. PLoS Med, 2016, 13(8): e1002072.

**背景** 糖尿病是发生结核病的一种众所周知的危险因素。糖尿病在中、低收入国家越来越普遍, 同时这些国家也是结核病的高负担地区。2015 年世界卫生组织提出了遏制结核病战略, 认为糖尿病是结核病控制中的一个重要危险因素和并发症。有研究表明, 血糖的控制可能会改变结核病发生的风险。可是, 目前对血糖控制和发生结核病风险之间关系的研究较少, 且结果并不一致。

**方法** 本研究是一项以社区为基础健康筛查服务的队列研究, 收集了 2005 年 3 月 5 日至 2008 年 7 月 27 日参加我国台湾北部一项基础健康筛查服务的 123 546 名社区健康体检人群。筛查采用空腹血糖来测定血糖控制情况。队列随访结核病的发病至 2012 年 12 月 31 日, 研究对比了糖尿病患者与非糖尿病人群结核病的发生率, 并采用 Cox 回归模型分析了血糖控制不佳者、血糖控制良好者发生结核病的风险(以无糖尿病的人群作为对照组), 分别计算校正后的危险比(*aHR*)与 95% 可信区间(95% *CI*)。

**结果** 经过中位时间为 4.6 年的随访, 123 546 名人群中发生结核病 327 例。多因素 Cox 回归模型显示, 糖尿病患者中血糖控制不佳者[空腹血糖  $>7.22$  mmol/L (130 mg/dl)]与非糖尿病人群相比, 结核病风险明显增加(*aHR* = 2.21, 95% *CI* = 1.63~2.99,  $P < 0.001$ ); 而血糖控制良好(空腹血

糖  $<7.22$  mmol/L)的糖尿病患者, 发生肺结核的风险与非糖尿病人群差异无统计学意义(*aHR* = 0.69, 95% *CI* = 0.35~1.36,  $P = 0.281$ )。通过线性剂量-反应分析, 结核病风险增加伴随空腹血糖的升高[每增加空腹血糖 0.56 mmol/L (10 mg/dl), *aHR* = 1.06, 95% *CI* = 1.03~1.08,  $P < 0.001$ ]。假设血糖控制与结核病之间存在因果关系, 可估计研究人群发生结核病的患者中 7.5% (95% *CI* = 4.1%~11.5%) 可以归因于血糖控制不佳。本研究的局限性主要为只在基线调查时进行了一次空腹血糖监测, 以及研究对象为自愿参加健康检查者。

**结论** 糖尿病是结核病的重要危险因素, 在未来数年中很可能影响结核病的疫情。在糖尿病和结核病流行的地区, 除了预防糖尿病的发生外, 良好的血糖控制亦能够降低结核病的潜在发生风险, 并有助于结核病的控制。

同济大学附属上海市肺科医院结核病临床研究中心  
上海市结核病(肺)重点实验室  
刘一典 编译 孙勤 审核

(收稿日期: 2017-07-04)  
(本文编辑: 郭萌)