

• 论 著 •

Xpert MTB/RIF 检测痰标本结核分枝杆菌与利福平耐受性的临床应用研究*

李 静¹, 林日文¹, 张灿强²

(1. 广东省惠州市结核病防治研究所检验科 516008; 2. 广东省惠州市惠城区慢性病防治站检验科 516000)

摘要:目的 分析 Xpert MTB/RIF 方法用于临床快速检测结核分枝杆菌(MTB)与利福平耐受性的临床意义。方法 收集 2015 年 1—12 月在惠州市结核病防治研究所及 5 个县区医院结核科就诊的肺结核患者痰标本 552 例,进行涂片镜检、Xpert MTB/RIF 核酸检测和改良罗氏培养,并对培养阳性者进行药敏实验。评价各种方法 MTB 检测灵敏度与特异性,对比传统药敏方法和 Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药性的结果并分析。结果 Xpert MTB/RIF 与改良罗氏培养法对 MTB 检测结果相比,敏感度 95.3%、特异性 93.1%;耐药性对比结果中,所有阳性标本中利福平耐药的敏感度 82.1%,特异性 97.8%;Xpert MTB/RIF 检测 MTB 分级与改良罗氏培养分级一致性分析中, $kappa=0.688$,提示两者结果具有良好的一致性。结论 Xpert MTB/RIF 可用于临床早期快速检测结核分枝杆菌与利福平耐药检测的筛查,有利于临床快速决策。

关键词:结核分枝杆菌; 利福平; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.04.019 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)04-0480-03

Study on clinical application of Xpert MTB/RIF for detecting Mycobacterium Tuberculosis in sputum sample and rifampicin resistance*

LI Jing¹, LIN Riwen¹, ZHANG Canqiang²

(1. Department of Clinical Laboratory, Huizhou Municipal Institute of Tuberculosis Prevention and Control, Huizhou, Guangdong 516008, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Huicheng District Station of Chronic Disease Prevention and Control, Huizhou, Guangdong 516000, China)

Abstract:Objective To analyzer the clinical significance of the Xpert MTB/RIF method for rapidly detecting Mycobacterium tuberculosis(MTB) and rifampicin resistance in clinic. **Methods** A total of 552 sputum samples were collected from the patients in the Huizhou Municipal Institute of Tuberculosis Prevention and Control and tuberculosis departments in 5 counties and districts from January 2015 to December 2015. Smear microscopic examination, Xpert MTB/RIF nucleic acid detection and improved Roche culture were performed. The samples of culture positive were performed the drug susceptibility test. The sensitivity, specificity of various methods for detecting MTB were evaluated. The results of conventional susceptibility test and Xpert MTB/RIF for detecting rifampicin resistance were compared and analyzed. **Results** Compared with the Roche culture method, the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF for detecting MTB were 95.3% and 93.1%. In the comparison of drug resistance detection results, the sensitivity and specificity of rifampicin resistance in all positive samples were 82.1% and 97.8%. In the consistency analysis of Xpert MTB/RIF and improved Roche culture for detecting MTB classification, $kappa=0.688$, indicating that the results of the two methods had good consistency. **Conclusion** The Xpert MTB/RIF method can be used in MTB early rapid detection and screening of rifampicin resistance detection, which is conducive to clinical rapid decision.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; rifampicin; drug resistance

虽然人们在防治结核病方面投入巨大,结核分枝杆菌(MTB)感染仍然是全球第 2 位引起死亡的独立感染性因素之一,仅次于 HIV。MTB 引起的肺结核严重危害人类健康,强传染性使其在我国需法定报告的乙类传染病中常年居于第 2 位^[1]。抽样调查显示国内每年新发肺结核患者约 100 万例,快速早期对 MTB 感染进行检测并及时进行干预对于肺结核防控具有重要的意义。目前诊断 MTB 感染的金标准是罗氏培养法,但细菌生长缓慢,通常需要 4~8 周^[2]。抗酸杆菌涂片镜检相对快速、廉价,但其灵敏度差,极易漏检。开发应用新的检测方法和模式刻不容缓。基于核酸扩增的检测技术可以有效解决灵敏度低,以及培养时间长的问题,因此, Gene Xpert MTB/RIF 应运而生。它是一种基于 RT-PCR 技术,可同时进

行 MTB 及利福平耐药性检测的自动化、全封闭检验平台,具有敏感度与特异度高、生物安全性好、耗时短等优点,成为世界卫生组织(WHO)推荐使用的分子药敏诊断技术^[3-4]。本研究通过比较涂片染色、罗氏培养和 Xpert MTB/RIF 检测,来验证此法对肺结核疑似患者痰液快速检测的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1—12 月在惠州市结核病防治研究所及 5 个县区医院结核科就诊的肺结核患者痰标本 552 例。进行涂片镜检、改良罗氏培养和 Xpert MTB/RIF 核酸检测,培养阳性者进行比例法药敏实验。

1.2 方法 痰涂片用 Zhiel-Neelsen 法染色镜检,痰培养用 L-J 培养基。药敏试验采用 WHO 指定的比例法。L-J 培养基中

* 基金项目:广东省惠州市科技计划项目(2016Y97)。
作者简介:李静,女,副主任技师,主要从事临床、微生物方面研究。

培养阳性后,经涂片确认为抗酸分枝杆菌,用比例法进行药敏试验。全过程严格按照质量控制标准操作。具体操作步骤参照《结核病诊断细菌学检验规程》。Xpert MTB/RIF 核酸检测:严格按照试剂盒说明书进行,检出结果高低值与耐药判定根据指导的循环阈值(CT 值)和 Δ CT 进行判断。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS22.0 统计分析软件进行处理。以细菌培养与表型药敏试验为金标准,通过计算敏感度、特异度,以评价 Xpert MTB/RIF 检出 MTB 及利福平耐药性的准确性和一致性,计数资料用率表示,组间采用 χ^2 检验。通过 *Kappa* 检验对 Xpert MTB/RIF 与金标准进行一致性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Xpert MTB/RIF 对痰标本 MTB 检测结果 利用 Xpert MTB/RIF 对 552 例痰标本进行检测,有 6 例痰标本被判断为“错误”或“无法判读”。排除此 6 例,最终有效例数为 546 例。在有效例数中,涂阳 127 例,涂阴 319 例。对比改良罗氏培养结果,以后者为金标准,则涂阳患者 Xpert MTB/RIF 对痰标本 MTB 检测敏感度为 95.6%(109/114),特异度为 69.2%(9/13);涂阴患者 Xpert MTB/RIF 对痰标本 MTB 检测敏感度为 94.1%(95/101),特异度为 95.0%(207/218);对所有有效检测标本检测的敏感度为 95.3%(204/214),特异度为 93.1%(216/232)。将 Xpert MTB/RIF 于罗氏培养结果进行 *Kappa* 检验,*Kappa*=0.813,说明一致性良好。McNemar 提示两者差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 Xpert MTB/RIF 检测结果比较(n)

Xpert MTB/RIF	涂阳			涂阴		
	培阳	培阴	合计	培阳	培阴	合计
阳性	109	4	113	95	11	106
阴性	5	9	14	6	207	213
合计	114	13	127	101	218	319

2.2 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 阳性标本对利福平耐药性分析 Xpert MTB/RIF 结果中,同时给出了对利福平耐药性的参考结果,总共阳性标本 204 例,涂阳 109 例,涂阴 95 例,与金标准比例法药敏结果相比较,涂阳患者中 Xpert MTB/RIF 对利福平耐药性敏感度为 72.7%(8/11),特异度为 98.0%(100/102);涂阴患者中 Xpert MTB/RIF 对利福平耐药性敏感度为 89.3%(25/28),特异度为 97.4%(76/78);对所有阳性标本利福平耐药的敏感度为 82.1%(32/39),特异度为 97.8%(176/180)。将 Xpert MTB/RIF 与罗氏培养结果进行 *Kappa* 检验,*Kappa*=0.824,提示一致性良好。且 McNemar 提示两者差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 阳性中对利福平耐药分析(n)

Xpert MTB/RIF	涂阳			涂阴		
	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计
耐药	8	2	10	25	2	27
敏感	3	100	103	3	76	79
合计	11	102	113	28	78	106

2.3 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 分级与改良罗氏培养分级一

致性分析 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 分级结果由分析仪直接给出。MTB 检出极低:CT 值=28~38,阳性级别极低,对应为 1+;MTB 检出低:CT 值=22~28,阳性级别低,对应为 2+;MTB 检出中等:CT 值=16~22,阳性级别中,对应为 3+;MTB 检出高:CT 值<16,阳性级别高,对应为 4+。改良罗氏培养基培养结果由人工判读:菌落布满整个斜面,为 4+;菌落较多,布满斜面约 3/4,为 3+;菌落布满斜面 1/2,为 2+;菌落较少,散布斜面约 1/4,为 1+;未见细菌生长,为阴性。对 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 分级与改良罗氏培养分级做一致性检验,*Kappa*=0.688,提示两者结果具有良好的一致性。所有检出结果分级情况见表 3。

表 3 Xpert MTB/RIF 检测 MTB 分级与改良罗氏培养分级一致性分析(n)

等级	4+	3+	2+	1+	阴性	合计
高	29	5	1	1	0	36
中	6	70	3	2	2	83
低	0	5	52	4	3	64
极低	0	1	2	27	7	37
未检出	0	1	3	2	320	326
无法判读	0	0	0	0	6	6
合计	35	82	61	36	338	552

3 讨 论

全球结核病感染防控都因为缺乏简单又准确的检测方法受到限制,尽管技术一直在发展,但结核病发病率并没有得到有效遏制^[5]。其绝对发病数量比以往任何时候都多(940 万/年),虽然全球发病率预计已达到顶峰并开始下降,对结核病控制工作进展仍非常缓慢。结核病耐药性增加形势也十分严峻^[6]。据统计,全球每年有近 44 万例耐多药结核病患者(MDR-TB)。Xpert MTB/RIF 检测通过核酸扩增的方法,2 h 完成分子快速检测诊断并同时评估利福平耐药性,受到 WHO 的认可和重视。本研究也旨在证实 Xpert MTB/RIF 检测在临床应用中的意义和价值^[7]。

本次研究中,通过收集 2015 年 1—12 月在惠州市结核病防治研究所及 5 个县医院结核科就诊的肺结核患者痰标本进行了 Xpert MTB/RIF 检测 and 传统方法的比对研究。在 552 例标本,除 Xpert MTB/RIF 报“错误”或“无法判读”6 例外,共计 546 例有效样本。其中,涂片镜检法阳性检出率 23.3%(127/546),改良罗氏培养法阳性检出率 39.2%(214/546),Xpert MTB/RIF 法阳性检出率 40.3%(220/546),涂片法检出率较低,Xpert MTB/RIF 法与固体培养法检出率相似,以培养法为金标准,则 Xpert MTB/RIF 法有着与培养法相似的检出率^[8]。

Xpert MTB/RIF 法与金标准方法相比较,涂阳患者中 MTB 检出敏感度为 95.6%(109/114),特异度为 69.2%(9/13);涂阴患者中检出敏感度为 94.1%(95/101),特异度为 95.0%(207/218);整体敏感度 95.3%(204/214),特异度 93.1%(216/232);*Kappa*=0.813,说明与金标准一致性良好;利福平耐药性检测结果比较中,涂阳患者利福平耐药性敏感度 72.7%(8/11),特异度为 98.0%(100/102);涂阴患者利福平耐药性敏感度 89.3%(25/28),特异度为 97.4%(76/78);整体利福平耐药的敏感度 82.1%(32/39),特异度 97.8%(176/

180), $Kappa=0.824$, 因为耐药菌株样本较小(共 36 例, 涂阳中 10 例), 其比率受单个结果影响较大, 真实比率还需要加大样本量进行验证。

在检测阳性结果分级的比较中, Xpert MTB/RIF 高、中、低、极低这 4 个水平与固体培养法的相对应, 观察结果发现, 分级结果相似性基本让人满意, 个别标本会被分在不同等级, 但也基本在左右相差一个等级, 不影响临床决策, 处于可接受范围内。高浓度菌种检测相似性更好, 在极低分类中, 改良罗氏有部分将其分类为阴性(7/37), 这有可能与技术员肉眼观察培养基斜面相关, 若 MTB 极低, 形成菌落不在中心, 很容易被忽视。

Xpert MTB/RIF 检测较少地依赖实验者的操作技能, 只需要简单的培训即可以应用相关软件和试剂盒进行检测操作并对结果进行判读, 这是 Xpert MTB/RIF 检测的一大优势, 其对于实验室人员专业技术要求较低, 对实验室安全也有更好的保障。另外, 它具有更短的周转时间(TAT), 同时检测 MTB 及利福平耐药性, 不到 3 h 即可得出结果。快速的分析检测, 也有利于医生更快做出决策, 减少患者可能的隔离时间, 预防医院潜在感染, 故 Xpert MTB/RIF 试验可作为 MTB 检测和利福平耐药检测的快速鉴定工具, 对于极低等级的结果, 可以通过培养和药敏实验进一步证实。

综上所述, Xpert MTB/RIF 虽然在耐药性检测上只能检测利福平, MTB 检测结果与培养法还是有一些差别, 但鉴于该方法与罗氏培养法良好的一致性、快捷性、更好的生物安全性和较低的成本, 在及时的患者干预方面有着重要的意义, 有助于患者病情控制和预防潜在的医院感染与结核病的传播, 可将其作为结核病疑似患者早期的主要筛查手段。从本次研究来看, Xpert MTB/RIF 展示出了良好的应用前景, 严格的临床应用还需要有更多的研究支持^[9]。

参考文献

[1] 张翊, 卢建平, 叶森. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床

(上接第 479 页)

报道^[11]称目前在非洲疟疾已经出现了耐药性, 现今, 在全球范围内疟原虫肆虐的局势不但没有得到改善, 在某些地区反而有加重的趋势^[12]。因此对于初次感染的患者要及时根据温度和滴度的变化调整用药方案, 避免耐药株的产生。

参考文献

[1] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 联合国维和行动利比里亚概况与主要痢疾防治[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003: 3.

[2] 谭伟龙, 王忠灿, 郁兴明, 等. 热区维和部队卫生防疫保障工作的做法与体会[J]. 东南国防医药, 2006, 8(3): 231-232.

[3] Lowy DR, Schiller JT. ProPhlactic human PaPillomavacines[J]. J Clin Invest, 2006, 116(5): 1167-1173.

[4] 张海谱, 梁霞, 李立青, 等. 利比里亚维和医疗队 4 例疟疾防控失败原因分析[J]. 解放军预防医学杂志, 2016, 34(2): 266.

[5] 张长青. 某部赴苏丹达尔富尔维和部队防治疟疾的措施[J]. 解放军预防医学杂志, 2014, 32(1): 71-72.

应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2006, 20(1): 14-17.

[2] 杨慧娟, 马利, 陈连勇, 等. Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌检测和耐多药结核快速筛查的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 23(3): 4056-4059.

[3] Luetkemeyer AF, Firnhaber C, Kendall MA, et al. Evaluation of xpert MTB/RIF versus AFB smear and culture to identify pulmonary tuberculosis in patients with suspected tuberculosis from low and higher prevalence settings[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(9): 1081-1088.

[4] 曾松芳, 郭美丽, 赵珊珊, 等. 结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术在肺结核快速诊断中的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 30(5): 683-685.

[5] 李妍, 张天华, 鲜小萍, 等. 利用 Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌及利福平耐药性的研究[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(10): 1762-1765.

[6] Metcalfe JZ, Makumbirofa S, Makamure B, et al. Xpert (R) MTB/RIF detection of rifampin resistance and time to treatment initiation in Harare, Zimbabwe[J]. Inter J Tube Dis, 2016, 20(7): 882-889.

[7] 田斌, 王孝君, 文岚. Xpert MTB/RIF 检测系统对肺结核临床诊断病例的应用价值[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 20(9): 798-801.

[8] 路晓红, 付玉荣, 伊正君. 基于核酸检测诊断结核分枝杆菌感染的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 10(10): 967-971.

[9] 陈钰, 罗力涵, 张波. 新型结核分枝杆菌快速检测技术研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2016, 25(4): 373-375.

(收稿日期: 2016-09-28 修回日期: 2016-11-19)

[6] 方向明, 赵玉农, 王庆明, 等. 驻利比里亚维和医疗分队诊治疟疾情况分析[J]. 白求恩军医学院学报, 2011, 9(1): 31-33.

[7] 焦炳欣, 郭杰, 陈志海, 等. 荧光定量 PCR 技术在疟疾诊断中的应用[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2012, 6(4): 308-311.

[8] 江海龙, 田利源, 王光辉, 等. 快速诊断试剂盒在援非人员疟疾诊断中的应用研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(1): 107-108.

[9] 营雅茹, 李卫东, 张滔, 等. 快速检测试剂条、镜检和 PCR 在疟疾诊断中的应用研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(2): 163-165.

[10] 杨荣助, 尹正留. 疟原虫 Malaria PLDH 快速检测技术的临床应用[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(1): 56-57.

[11] 韩韬, 代勇. 简述使用青蒿素联合西药治疗疟疾的研究进展[J]. 当代医药论从, 2015, 13(6): 10-11.

[12] 张楠. 青蒿素类药物的主要研究进展[J]. 中国药物评价, 2013, 30(1): 13-16.

(收稿日期: 2016-10-11 修回日期: 2016-12-02)