

· 论 著 ·

Xpert MTB/RIF 在快速诊断肺结核及利福平耐药中的临床应用

周洪经^{1,2}, 郭明日¹, 冯 爽¹, 张丽霞^{1△}

(1. 天津市海河医院检验科 300350; 2. 国家中医药管理局中医防治传染病重点实验室, 天津 300350)

摘要:目的 探讨利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF)在肺结核诊断及其耐药性检测中的临床应用价值。方法 收集 408 例结核患者标本,同时采用抗酸染色法、固体培养法及 Xpert MTB/RIF 检测,并对其结果进行分析比较。结果 408 例标本抗酸染色法、固体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测出结核分枝杆菌的阳性率分别为 25.00%(102/408)、42.16%(172/408)和 58.09%(237/408)。经统计学分析,Xpert MTB/RIF 阳性率高于抗酸染色法和固体培养法,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中,固体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测均为阳性的标本共 168 例,经比例法药物敏感试验与 Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药率分别为 26.19%(44/168)和 27.38%(46/168),2 种方法耐药率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),以比例法药敏试验作为金标准,Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的敏感度为 97.73%(43/44),特异性为 97.58%(121/124)。结论 Xpert MTB/RIF 可快速、准确检测结核分枝杆菌及利福平耐药性,具有重要的临床应用价值。

关键词:结核分枝杆菌; Xpert MTB/RIF; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)18-2568-03

Application of Xpert MTB/RIF assay on rapid detection of MTB and rifampin-resistant

ZHOU Hongjing^{1,2}, GUO Mingri¹, FENG Shuang¹, ZHANG Lixia^{1△}

(1. Laboratory Medical of Haihe Hospital, Tianjin 300350; 2. State Administration of Traditional Chinese Medicine Key Laboratory of Infections Disease Prevention and Control, Tianjin 300350)

Abstract: Objective To investigate clinical value of Xpert MTB/RIF assay on rapid detection of MTB and rifampin-resistant. Methods 408 cases of tuberculosis were detected by acid-fast stain, Solid culture and Xpert MTB/RIF, the results were compared. Results All the samples were detected by acid-fast stain, culture and Xpert MTB/RIF assay, the positive rates were 25.00%(102/408), 42.16%(172/408) and 58.09%(237/408), respectively. The positive rates of Xpert MTB/RIF assay were higher than acid-fast stain and culture method, and the difference is statistically significant ($P < 0.05$). There are 168 cases of specimen which were tested positively by both culture and Xpert MTB/RIF, the RIF resistance rates from standard drug susceptibility testing and Xpert MTB/RIF assay respectively were 26.19%(44/168) and 27.38%(46/168), and had no statistical significance ($P > 0.05$). According to the result of drug susceptibility with proportion method, the sensitivity and specificity of Xpert MTB/RIF in detecting RIF resistance were 97.73%(43/44) and 97.58%(121/124). Conclusion Xpert MTB/RIF can quickly and accurately detect MTB and RIF resistance, it has important clinical significance.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; Xpert MTB/RIF; drug-resistance

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)引起的严重危害人类健康的慢性传染性疾病,据 2010 年全国第 5 次结核病流行病学抽样调查结果显示,全国活动性肺结核患者高达 499 万例,每年新发结核患者约 100 万例^[1]。实验室检查为结核病的确证提供病原学证据,也是确诊传染性结核尤其是耐多药结核病的重要依据。目前,我国对结核病的诊断主要依赖于传统的抗酸染色法和培养法,这些诊断方法的敏感度及特异度较低,且耗时耗力,无法满足临床需要,因而,迫切需要 1 种早期、快速、准确诊断结核病及其耐药性的方法。新型的实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF)全自动检测系统以全自动半巢式实时聚合酶链反应技术为基础,以 rpoB 基因为靶基因,可在 2 h 内同时检测 MTB 和利福平耐药,该方法于 2010 年 12 月世界卫生组织批准用于 MTB 及多重耐药 MTB(MDR-TB)的快速诊断。本文采用 Xpert MTB/RIF 系统对肺结核患者 MTB 及其对利福平耐药性进行检测,并与传统的检测方法进行对比分析,评价 Xpert MTB/RIF 技术在结核病快速诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 1 月至 2016 年 1 月期间在海河医院治疗的结核病患者 408 例,其中,痰标本 276 例,灌洗液 132 例。

1.2 仪器与试剂 Xpert MTB/RIF 反应盒及 SR 标本处理液(美国 Cepheid 公司);分枝杆菌涂片镜检萋尼染色液、酸性罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司)。

1.3 方法 所有标本均同时进行萋尼抗酸染色、固体培养和 Xpert MTB/RIF 检测。

1.3.1 抗酸染色法 采用离心浓缩法,参照《结核病实验室标准化操作与网络建设》^[2]。镜检结果根据抗酸菌量多少判读为 4+、3+、2+、1+、1~8 条、阴性。

1.3.2 固体培养法 采用中和离心法。痰标本置于 50 mL 离心管中,加入 2 倍体积 4% NaOH 涡旋振荡 1 min,室温静置 20 min,加入磷酸盐缓冲液(pH6.8)至 50 mL,3 000 r/min 离心 20 min,弃上清;灌洗液直接 3 000 r/min 离心 20 min,弃上清。沉淀加入 1~2 mL 磷酸盐缓冲液,混悬接种于罗氏固体

培养基,于 37 °C 培养箱培养,接种后第 3、7 天观察培养情况,以后每周观察 1 次,并记录生长情况。

1.3.3 药物敏感性试验 制备 1 mg/mL 菌悬液,梯度稀释为 10⁻² 和 10⁻⁴ mg/mL,接种到含 RIF(40 μg/mL)的罗氏固体培养基和空白对照管培养基,37 °C 培养 4 周,观察结果。每批药物敏感性试验用 H37Rv 作为敏感对照,以评价含药培养基质量。

1.3.4 Xpert MTB/RIF 核酸扩增检测 取 1 mL 痰标本加入前处理管中,视样本性状加入 2 倍样本体积的 SR 处理液,灌洗液经离心后加入 2 mL SR 处理液,涡旋振荡 15~30 s,静置 15 min。吸取 2 mL 处理后样本缓慢加入反应盒,放入检测模块开始进行自动化检测。对 MTB 结果判读根据 DNA 拷贝的高低分为高、中、低、极低和未检测出 5 个等级;RIF 药敏结果分为:RIF Resistance 检出,RIF 耐药和 RIF Resistance 未检出,RIF 敏感。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,率之

间比较采用 χ^2 检验和确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种检测方法阳性结果比较 408 例标本均同时采用抗酸染色法、固体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测,其阳性率分别为 25.00%(102/408)、42.16%(172/408)和 58.09%(237/408),经统计学分析,Xpert MTB/RIF 与抗酸染色法阳性率比较($P < 0.05$),差异有统计学意义;与固体培养法阳性率比较($P < 0.05$),差异有统计学意义,Xpert MTB/RIF 检测 MTB 的阳性率高于抗酸染色法和固体培养法,结果见表 1。

276 例痰标本经抗酸染色法、固体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测的阳性率分别为 27.53%(76/276)、43.84%(121/276)、57.61%(159/276);132 例灌洗液经 3 种方法检测的阳性率分别为 19.70%(26/132)、38.63%(51/132)、59.09%(78/132)。Xpert MTB/RIF 检测痰标本与灌洗液标本阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 3 种检测方法阳性结果比较(n)

标本类型	n	抗酸染色阳性				抗酸染色阴性			
		培养阳性		培养阴性		培养阳性		培养阴性	
		Xpert 阳性	Xpert 阴性	Xpert 阳性	Xpert 阴性	Xpert 阳性	Xpert 阴性	Xpert 阳性	Xpert 阴性
痰	276	67	0	9	0	51	3	32	114
灌洗液	132	23	1	2	0	27	0	26	53
合计	408	90	1	11	0	78	3	58	167

2.2 Xpert MTB/RIF 与抗酸染色法检出菌量比较 276 例痰标本中,Xpert MTB/RIF 检测高、中、低、极低、未检测出 5 个量级的例数和抗酸染色检测为 4+、3+、2+、1+、1~8 条、阴性的例数详见表 2。Xpert MTB/RIF 检测“高”量级 25 例中涂片染色有 2 例为阴性,“中”量级 69 例中涂片染色有 21 例为阴性,“低”量级 42 例中涂片染色有 37 例为阴性,“极低”量级 23 例中涂片染色检测全部为阴性。

表 2 痰标本中 Xpert MTB/RIF 与抗酸染色法检出菌量比较(n)

抗酸染色	Xpert MTB					
	高	中	低	极低	阴性	合计
4+	6	1	0	0	0	7
3+	11	6	0	0	0	17
2+	5	14	0	0	0	19
1+	1	19	2	0	0	22
1~8	0	8	3	0	0	11
阴性	2	21	37	23	117	200
合计	25	69	42	23	117	276

132 例灌洗液标本中 Xpert MTB/RIF 检测高、中、低、极低、未检测出 5 个量级的例数以及抗酸染色法检测为 4+、3+、2+、1+、1~8 条、阴性的例数见表 3。Xpert MTB/RIF 检测“高”量级 5 例中涂片染色全部为阳性,“中”量级 16 例中涂片染色有 4 例为阴性,“低”量级 24 例中涂片染色有 16 例为阴性,“极低”量级 33 例中涂片染色检测全部为阴性。

表 3 灌洗液标本中 Xpert MTB/RIF 法与抗酸染色法检出菌量比较(n)

抗酸染色	Xpert MTB					
	高	中	低	极低	阴性	合计
4+	1	0	0	0	0	1
3+	1	1	0	0	0	2
2+	2	3	1	0	0	6
1+	1	7	4	0	1	13
1~8	0	1	3	0	0	4
阴性	0	4	16	33	53	106
合计	5	16	24	33	54	132

表 4 Xpert MTB/RIF 与比例法检测利福平耐药性比较(n)

Xpert MTB/RIF	比例法		
	耐药	敏感	合计
耐药	43	3	46
敏感	1	121	122
合计	44	124	168

2.3 Xpert MTB/RIF 与比例法检测利福平耐药性比较 固体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测均为阳性的标本共 168 例,比例法药物敏感试验与 Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药菌分别为 44 例和 46 例,耐药率分别为 26.19%(44/168)和 27.38%(46/168),Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药率与比例法相比

较,差异无统计学意义($P < 0.05$)。2 种方法检测利福平都耐药的菌株有 43 例,均为敏感的菌株 121 例,以比例法药物敏感试验作为金标准,Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的敏感度为 97.73%(43/44),特异性为 97.58%(121/124),检测结果见表 4。

3 讨 论

传统的结核病诊断方法的敏感度和特异度较低且耗时耗力,无法满足临床需要,近年来,随着分子生物学技术的发展,越来越多的分子诊断技术不断涌现,Xpert MTB/RIF 技术便是其中之一。该技术是将 PCR 所需的 3 个步骤即样本准备、扩增、检测集于一体的实时荧光定量核酸扩增检测技术,操作简便,试验中基本不产生气溶胶,极大程度地减少了操作中污染的可能性。该方法自动运行并检测是否为 MTB 及是否对 RIF 耐药,快速、简便完成整个试验约 2 h。

本文对 408 例结核患者标本同时采用抗酸染色法、固体培养法和 Xpert MTB/RIF 检测,Xpert MTB/RIF 法具有更高的敏感度及特异度^[3-4]。Xpert MTB/RIF 检测痰标本与灌洗液标本阳性率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),这与相关的报道基本一致^[5-6]。表 2、3 显示,Xpert MTB/RIF 检测为“低”和“极低”2 个量级的标本,抗酸染色法的阳性率极低,这与国外报道类似^[7-8]。表 1 中有 1 例抗酸染色法和培养阳性而 Xpert MTB/RIF 检测为阴性的标本,后经菌种鉴定为胞内分枝杆菌。

传统的 MTB 药敏试验需要进行菌株的分离培养,耗时长达 2 个月,而 Xpert MTB/RIF 可快速测定对利福平的耐药情况,并且具有较高的符合率,为临床选择药物治疗提供重要依据。对于 Xpert MTB/RIF 与比例法检测 RIF 耐药结果不一致的 4 株菌,可能与药物敏感性试验的控制条件不良有关,也可能与某些基因位点突变的低水平耐药相关^[9]。

综上所述,Xpert MTB/RIF 具有敏感度及特异度高、检出时间短的优势,适用于抗酸染色阴性的可疑结核病患者的快速诊断,并且与参考方法的药敏试验结果有较高的符合率。

参考文献

[1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国

第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012,34(8):485-508.

[2] 赵雁林,刘志敏. 结核病实验室标准化操作与网络建设[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:227-280.

[3] Mour R, Munoz 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.

[4] 李辉,谭耀驹,李洪敏. 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[J]. 中国防痨杂志 2014,36(6):472-476.

[5] 刘亚芹,杨振斌. Gene Xpert MTB/RIF 法检测 MTB 及其对利福平耐药性的研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2015,9(4):524-527.

[6] 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]. 医学检验, 2016,31(1):52-55.

[7] 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[J]. PLoS One, 2011,6(6):20458.

[8] Lawn SD, Nicol MP. Xpert MTB/RIF assay: development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin resistance[J]. Future Microbiology, 2015,6(9):1067-1082.

[9] 张卓然,夏梦岩,倪语星,等. 微生物耐药的基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:193-287.

(收稿日期:2016-04-27 修回日期:2016-07-05)

(上接第 2567 页)

[J]. World Journal of Gastroenterology, 2005, 11(45): 7063-7071.

[4] Watanabe T, Tada M, Nagai H, et al. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils[J]. Gastroenterology, 1998,115(3):642-648.

[5] Venerito M, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter pylori: gastric cancer and extragastric malignancies-clinical aspects[J]. Helicobacter, 2013, 18(Suppl1):39-43.

[6] Selgrad M, Tammer I, Langner C, et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of Helicobacter pylori infection[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014,20(43):16245-16251.

[7] Gisbert JP, Romano M, Molina-Infante J, et al. Two-week, high-dose proton pump inhibitor, moxifloxacin triple Helicobacter pylori therapy after failure of standard

triple or non-bismuth quadruple treatments[J]. Dig Liver Dis, 2015,47(2):108-113.

[8] Czesnikiewicz-Guzik M, Loster B, Bielanski W, et al. Implications of oral Helicobacter pylori for the outcome of its gastric eradication therapy[J]. J Clin Gastroenterol, 2007,41(2):145-151.

[9] Scherübl H, Fischbach W, Glocker E, et al. What is new in treating Helicobacter pylori infection [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2015,140(4):277-280.

[10] Ferreira J, Moss SF. Current paradigm and future directions for treatment of helicobacter pylori infection[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2014,12(4):373-384.

[11] Bang CS, Baik GH. Attempts to enhance the eradication rate of Helicobacter pylori infection[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(18):5252-5262.

(收稿日期:2016-04-08 修回日期:2016-06-15)