

· 临床论著 ·

GeneXpert法检测结核分枝杆菌及其对利福平耐药性的研究

刘亚芹 杨振斌 冯冬霞 孙凤芝

【摘要】 目的 探讨GeneXpert MTB/RIF (简称Xpert) 法检测结核分枝杆菌及其利福平耐药性的可行性。**方法** 选取2013年3月至6月在本院就诊的413例疑似肺结核病患者, 对其痰标本分别进行抗酸染色镜检、培养、比例法体外药敏试验和Xpert法检测, 并以传统的罗氏固体培养和比例法药敏试验为金标准, 对Xpert法检测结果进行分析。**结果** 以培养法为金标准, Xpert法检测197例涂阴患者的敏感性为55.2%, 特异性为93.5%, 与培养法检测结果差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.04$, $P = 0.841$); Xpert检测214例涂阳患者的敏感性97.5%, 特异性54.5%, 与培养法检测结果差异也无统计学意义 ($\chi^2 = 0.10$, $P = 0.752$)。以比例法药敏为金标准, 对214例培养阳性的患者, Xpert法检测利福平耐药的敏感性为95.3%, 特异性为99.4%, 与比例法检测结果差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.00$, $P = 1.000$)。**结论** Xpert法适用于结核分枝杆菌及耐药结核分枝杆菌的快速筛查。

【关键词】 结核分枝杆菌; GeneXpert MTB/RIF; 耐药性; 利福平; 痰标本

Analysis on GeneXpert MTB/RIF test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance Liu Yaqin, Yang Zhenbin, Feng Dongxia, Sun Fengzhi. Liaocheng Infectious Diseases Hospital, Shandong Province, Liaocheng 252000, China

Corresponding author: Sun Fengzhi, Email: sunfengzhi1974@sohu.com

【Abstract】 Objective To evaluate the test of GeneXpert MTB/RIF (Xpert) in detecting tuberculosis and resistance to rifampin. **Methods** Total of 413 patients with tuberculosis were chosen from March to June in 2013 in our hospital, the sputum samples were collected to do smear, Lwenstein-Jensen culture, traditional proportion method drug susceptibility test and Xpert. The traditional culture and susceptibility test were used to evaluate the detection effects of the new method as golden standard. **Results** According to solid culture result, the sensitivity and specificity of Xpert test in detecting 197 sputum smear-negative pulmonary tuberculosis cases were 55.2% and 93.5%, respectively, and there was no significant difference of testing results between Xpert and solid culture ($\chi^2 = 0.04$, $P = 0.841$). The sensitivity and specificity of Xpert test in detecting 214 sputum smear-positive pulmonary tuberculosis cases were 97.5% and 54.5%, respectively, with no significant difference ($\chi^2 = 0.10$, $P = 0.752$). According to the result of conventional drug susceptibility with Proportion method, the sensitivity and specificity of Xpert test in detecting rifampin resistance were 95.3% and 99.4%, respectively, and there was no significant difference of testing results between Xpert and susceptibility test ($\chi^2 = 0.00$, $P = 1.000$). **Conclusions** Xpert test was suitable as a first-line screening assay in detecting tuberculosis and Rifampin resistance.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; GeneXpert MTB/RIF; Drug resistance; Rifampin; Sputum

目前我国结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 的常规检测方法主要是痰涂片抗酸染色镜检、MTB罗氏固体培养和比例法药敏试验。抗酸染色镜检方法的阳性检出率低, 而罗

氏固体培养方法耗时过长, 均不能满足临床诊疗的需求。GeneXpert MTB/RIF检测系统 (简称Xpert) 由美国Cepheid公司研发, 是目前世界上唯一将样品准备、定量PCR扩增和荧光检测集于一身并自动进行核酸分析的系统。该系统采用半巢式PCR, 针对rpoB基因81 bp利福平 (rifampicin, RIF) 耐药区间设计了5个相互重叠的分子探针 (以探针A、B、C、D、E命名) 选择性覆盖了该基因的81 bp核心

区,以检测是否有MTB以及对RIF是否耐药,另一探针为球芽孢杆菌(以SPC命名)为内对照,以判断DNA扩增效率及检测效率^[1-2]。本文以MTB罗氏培养和比例法药敏试验为金标准,探讨Xpert检测MTB及耐药MTB的应用价值。

资料和方法

一、标本来源

2013年3月至6月本院疑似肺结核患者413例,年龄16~93岁,平均年龄(45.93 ± 2.41)岁。其中男性227例,占72.8%,女性85例,占27.2%。其中涂阴患者197例,涂阳患者216例。连续留取患者晨痰标本3次,送检。

二、仪器与试剂

Xpert检测系统及其配套试剂盒-Cartridge反应盒(美国Cepheid公司),SR(Sample Reagent, SR)痰标本处理液(美国Cepheid公司),酸性和中性罗氏培养基、异烟肼(isoniazid, INH)和RIF药敏培养基及对硝基苯甲酸(P-nitrobenzoic acid, PNB)培养基、噻吩-2-羧酸肼(2-thiophenecarboxylic acid hydrazide, TCH)培养基,均购自珠海贝索生物技术公司。

三、方法

1. 固体培养^[3]:痰标本加入等量4%的氢氧化钠,振荡静置20 min,无菌吸管吸100 μ l接种到酸性罗氏培养基上,放37 $^{\circ}$ C培养箱培养30 d。

2. 比例法体外药敏试验^[3]:制备1 mg/ml菌悬液。分别稀释成 10^{-2} mg/ml、 10^{-4} mg/ml菌液,再用22 SWG标准环分别取1满环 10^{-2} mg/ml和 10^{-4} mg/ml菌液,接种至含药培养基和对照培养基,37 $^{\circ}$ C培养4周后报告结果。若耐药百分比 $< 1\%$ 则判耐药。耐药百分比=含药培养基的菌落数/对照培养基的菌落数 $\times 100\%$ 。

3. Xpert检测:(1)前处理:取1 ml痰入管

中,加入痰2倍体积的SR,震荡20 s后,静置15 min。用专用吸管取2 ml处理后样液从Cartridge(反应盒)的加样孔缓慢加入其内。

(2)检测:开启Xpert仪和电脑,进行自检,待模块到可用后,将Cartridge放入模块中,系统自动进行核酸提取、扩增,目标序列的检测和结果判断。1 h 45 min就可判断患者是否患有结核及是否对利福平耐药。

(3)结果判读:Xpert对MTB的结果分为:MTB检出和未检出。CT是指探针循环阈值, Δ CT指探针早期CT值与晚期CT值之差,Xpert对RIF耐药的检测结果分为:RIF Resistance检出, Δ CT ≥ 3.5 ,RIF耐药;RIF resistance未检出, Δ CT < 3.5 ,RIF敏感。

四、统计学处理

建立Excel收集试验数据,运用SPSS 19.0软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验;计数资料采用百分比表示,统计分析采用配对四格表的 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、Xpert法与培养法检测MTB的比较

1. 涂阴患者结果比较:涂片阴性的197例患者,酸性罗氏固体培养阳性的患者29例,Xpert检测为阳性27例,均为MTB检出极低。两种方法比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.04$, $P = 0.841$),见表1。以酸性罗氏固体培养结果为金标准,Xpert检测涂阴患者的敏感性为55.2% (16/29)和特异性为93.5% (157/168)。

2. 涂阳患者结果比较:涂片阳性的216例患者,酸性罗氏固体培养203例阳性。经过PNB和TCH初步鉴定,2例是非结核分枝杆菌,这2例

表1 Xpert 检测涂阴结核患者结果

Xpert	酸性罗氏培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	16	11	27
阴性	13	157	170
合计	29	168	197

注:结果判定以酸性罗氏培养为金标准

表2 Xpert 检测涂阳结核患者结果

Xpert	酸性罗氏培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	198	5	203
阴性	5	6	11
合计	203	11	214

注:结果判定以酸性罗氏培养为金标准

Xpert结果为MTB未检测出,后采用PCR-直接测序法^[4](Microseq基因分析仪进行测序)证实均为胞内分枝杆菌。除去这2例非结核分枝杆菌,其余214例结果见表2。两种方法比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.10$, $P = 0.752$)。以酸性罗氏固体培养结果为金标准,Xpert检测涂阳患者的敏感性为97.5%(198/203)和特异性为54.5%(6/11)。

二、Xpert与比例法检测RIF耐药性的比较

对于Xpert与比例法都检测出结果的214例结核患者(均为培养阳性的患者,包括198例涂阳培阳患者和16例涂阴培阳患者),Xpert对RIF耐药性的检测结果见表3,Xpert与比例法相比,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.00$, $P = 1.000$)。Xpert检测RIF耐药性的敏感性为95.3%(41/43)和特异性为99.4%(170/171)。

16例涂阴结核患者中,初治患者10例,复治患者6例。这16例中只1例复治患者,比例法药敏为单耐RIF,Xpert也为RIF耐药,Xpert与比例法药敏结果一致。198例涂阳结核患者中初治涂阳患者117例,复治涂阳81例,初治涂阴患者中,比例法药敏显示RIF耐药15例(其中2例单耐RIF,13例为同时耐RIF和INH);Xpert显示RIF耐药检出为16例(其中3例单耐RIF,13例同时耐RIF和INH)。复治涂阳患者中,比例法药敏显示2例患者单耐RIF,25例患者同时耐RIF和INH;Xpert显示RIF耐药25例,与比例法相比,Xpert漏检的2例患者中,1例是同时耐RIF和INH,1例单耐RIF。

讨 论

MTB分裂一代约需15~20 h,所以以MTB生长为基础的传统培养和比例法体外药敏试验虽然结果可靠,但需要时间长约4~6周。因此用传统的培养和体外药敏方法来检测MTB耐药性,有可能延误治疗^[5]。Xpert检测操作简便,实验中基本不产生气溶胶,温度范围从15~30℃,即使在高湿度环境中也无影响。该方法采用氢氧化钠和异丙醇处理样品,可大大减少痰MTB检查的生物危害的风险^[6-7]。而且以分子生物学方法为基础的Xpert

技术比传统方法快的多,在东南亚、非洲的一些国家也开始应用。Xpert通过检测抗痨治疗两个基本药物之一的利福平耐药相关基因rpoB,以rpoB基因为靶基因,自动提取DNA后扩增rpoB基因进行检测,同时采用6种分子信标同时检测6种探针(A、B、C、D、E和SPC)进行MTB检测及对RIF耐药。rpoB基因作为RIF耐药相关基因的原因是95%以上的RIF耐药菌株有rpoB基因变异,几乎所有RIF敏感菌株在该区域具有相同的核酸序列,提示rpoB基因具有鉴定RIF耐药菌株的能力^[8]。由于MTB对RIF的耐药率远低于对INH的耐药率,大部分RIF耐药菌株同时对INH耐药,因此,通过Xpert检测出RIF耐药在一定程度上可以作为耐多药MTB的筛查指标,本研究中复治涂阳的Xpert检测为RIF耐药的患者中有96.0%(24/25)的是耐多药患者,初治涂阳中有81.3%(13/16)的耐多药患者,也证实了这一点。Xpert检测无论在涂阴还是涂阳的患者中对MTB的检出与传统方法相比差异无统计学意义,而且对于2例非结核分枝杆菌,Xpert检测无交叉。以酸性罗氏固体培养结果为金标准,本文中Xpert检测涂阳患者MTB的敏感性为97.5%,与张治国等^[9]报道的Xpert检测涂阳患者MTB的敏感性98.1%(309/315)相近。2010年,Boehme等^[10]报道Xpert在检测痰涂片阴性,培养阳性的患者中MTB总的灵敏度达90.2%。西班牙^[11]、法国^[12]和美国^[13]分别开展的3项Xpert试验显示Xpert对痰涂片阳性标本的敏感度为98%~100%^[11-12],对痰涂片阴性标本的敏感度为57%~83%^[11-13],与本研究结果相近,提示该方法对痰涂片阳性标本的敏感度较高,对痰涂片阴性标本的敏感度相对较低^[13-15]。据阿姆斯特丹全球健康和发展组织预测,Xpert将是在低中等收入的国家中的结核诊断上一个性价比高的方法,目前Xpert检测已经被WHO认可。

综上,Xpert检测具有快速、灵敏度好,同时能检测RIF耐药的特点,可作为临床快速检测MTB及其耐药株的筛选试验,尤其是在耐多药MTB的筛选中具有重要价值。可以为临床诊断、选择和调整耐药结核的治疗方案提供参考,在积极应对耐多药结核病,降低其病死率方面有重要意义。

表3 Xpert检测培阳结核患者对RIF耐药性的结果

Xpert	比例法		合计
	耐药	敏感	
耐药	41	1	42
敏感	2	170	172
合计	43	171	214

注:结果判定以比例法药敏为金标准

参 考 文 献

- 1 Musser JM. Antimicrobial agent resistance in *Mycobacteria*: molecular genetic insights[J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(4): 496-514.
- 2 Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex Indicates evolutionarily recent global dissemination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(18): 9869-9874.
- 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: 46-51.
- 4 赵建宏, 李雅静, 温海楠, 等. 非结核分枝杆菌感染的分子诊断研究进展[J]. 检验医学, 2012, 27(3): 156-158.
- 5 Van Rie A, Page-Shipp L, Scott L, et al. Xpert® MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10(7): 937-946.
- 6 Trébucq A, Enarson DA, Chiang CY. Xpert® MTB/RIF for national tuberculosis programmes in low-income countries: when, where and how[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(12): 1567-1572.
- 7 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 Microbiol, 2011, 6(9): 1067-1082.
- 8 Picard FJ, Gagnon M, Bemier MR, et al. Internal control for nucleic acid testing based on the use of purified *Bacillus atrophaeus* subsp *globigii* spores[J]. Clin Microbiol, 2009, 47(3): 751-757.
- 9 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[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(1): 13-16.
- 10 Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampicin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.
- 11 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]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 1137-1139.
- 12 Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of *Mycebaetefium tubereulosis* in respiratory and nonrespiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1772-1776.
- 13 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]. J Clin microbiol, 2011, 49(4): 1621-1623.
- 14 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): e20458.
- 15 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[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(1): 132-140.

(收稿日期: 2014-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

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[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(4): 524-527.