

GeneXpert MTB/RIF 试验与 4 种结核
分枝杆菌检测方法的比较*陈军¹ 陈丽峰¹ 饶有益¹ 余坚¹ 任易¹

[摘要] 目的:比较 GeneXpert MTB/RIF 试验(Xpert 试验)与 4 种结核分枝杆菌检测方法,探讨 Xpert 试验在肺结核快速诊断中的应用价值。方法:收集 2015-08—2016-02 武汉市肺科医院各病区送检的同一患者的 3 份痰标本共计 536 例,同时进行荧光抗酸染色涂片、结核分枝杆菌核酸扩增荧光检测(TB-DNA PCR)、Xpert 试验、罗氏固体培养及 MGIT960 液体培养检测,比较 5 种方法在诊断结核病中的敏感度与特异度。结果:荧光抗酸染色涂片、TB-DNA PCR、Xpert 试验、罗氏固体培养及 MGIT960 液体培养检测结核分枝杆菌的敏感度分别为 42.97%、57.57%、62.43%、54.59% 和 62.43%;特异度分别为 95.27%、99.21%、98.42%、88.97% 及 88.19%。在涂片阳性肺结核中,Xpert 检出率为 99.37%(158/159),MGIT960 培养检出率为 98.11%(156/159);在涂片阴性肺结核中,Xpert 检出率为 34.60%(73/211),MGIT960 培养检出率为 35.55%(75/211)。在 220 例 Xpert 检测与培养均阳性的标本中,两者均耐药为 32 例,均敏感为 179 例,Xpert 利福平耐药而比例法敏感为 8 例,Xpert 利福平敏感而比例法耐药为 1 例。2 种方法检测利福平耐药具有高的一致性(Kappa 值 0.85)。结论:Xpert 试验在肺结核诊断中具有与金标准液体培养一致的敏感性,同时快速筛查利福平耐药结核,对控制耐药结核的传播具有重要的临床价值,值得在临床推广应用。

[关键词] GeneXpert MTB/RIF 试验;结核分枝杆菌;检测;MGIT960

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2018.12.019

[中图分类号] R378.91 **[文献标志码]** A

Comparison of GeneXpert MTB/RIF assay with four mycobacterium
tuberculosis(MTB) detection methods

CHEN Jun CHEN Lifeng RAO Youyi YU Jian REN Yi

(Department of Clinical Laboratory, Wuhan Municipal Pulmonary Hospital, Wuhan, 430030, China)

Corresponding author:REN Yi,E-mail:menease@sina.com

Abstract Objective: To explore rapid diagnosis of GeneXpert MTB/RIF assay (Xpert assay) on tuberculosis by comparing Xpert with four mycobacterium tuberculosis (MTB) detection methods. **Method:** From August 2015 to February 2016, 536 patients were included in the study, 3 sputum specimens from every patient were collected for smear fluorescent staining, TB-DNA PCR, Xpert assay, L-J solid culture and MGIT960 liquid culture. Sensitivity and specificity of 5 detection methods were compared. **Result:** Sensitivities of smear fluorescent staining, TB-DNA PCR, Xpert assay, L-J solid culture and MGIT960 liquid culture were 42.97%, 57.57%, 62.43%, 54.59% and 62.43%, respectively. Specificities of five methods were 95.27%, 99.21%, 98.42%, 88.97% and 88.19%. Among the smear-positive patients, the detection rates of Xpert and MGIT960 liquid culture were 99.37% (158/159), 98.11% (156/159) respectively; among the smear-negative patients, the detection rates of Xpert and MGIT960 liquid culture was 34.60% (73/211), 35.55% (75/211) respectively. MTB was detected by Xpert and MGIT960 liquid culture from 220 patients, in which 32 strains were resistant to rifam-

* 基金项目:2013 年度武汉市卫计委临床医学科研项目(No:WX13B22);2014 年度武汉市临床医学科研项目(No:WX14C56)

¹ 武汉市肺科医院(市结核病防治所)检验科(武汉,430030)

通信作者:任易,E-mail:menease@sina.com

可以作为进一步评估女性患者发生输血无效风险的重要参考依据。

参考文献

- [1] 马光丽,方柄木,曲志刚,等.影响红细胞输注效果的多因素 Logistic 回归分析[J].中华全科医学,2014,12(3):347-349.
- [2] 洪毅.红细胞输注效果不佳与回忆反应的分析研究[J].临床血液学杂志,2017,30(10):797-799.
- [3] 兰炯采,负中桥,陈静娴.输血免疫学实验技术[M].北京:人民卫生出版社,2011:187-188.
- [4] 朱奕,伍昌林,党鑫堂,等.红细胞输注效果的影响因素分析[J].医学综述,2012,18(24):4261-4262.
- [5] Dzik WH, Corwin H, Goodnough LT, et al. Patient safety and blood transfusion: new solutions[J]. Transfusion Med Rev, 2003, 17: 169-180.

(收稿日期:2018-04-10)

pacin by two methods, 179 strains were sensitive to rifampicin by two methods, 8 strains were resistant by Xpert, but sensitive by the proportion method, 1 strain was sensitive by Xpert, but resistant by the proportion method. The two methods had excellent consistency (Kappa value 0.85) **Conclusion:** Xpert assay has similar sensitivity with the gold standard MGIT960 liquid culture in diagnosis of tuberculosis and can rapidly screen resistance of rifampicin. The method is worth expanding and applying in clinical practice.

Key words GeneXpert MTB/RIF test; Mycobacterium tuberculosis; detection; MGIT960

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病,是全球最具威胁的传染病之一。据世界卫生组织 2017 年报告,2016 年全球新发结核患者约 1 040 万,由结核病导致死亡约 170 万人,仍然为全球 10 大死亡原因之一^[1]。目前,临床实验室传统的分枝杆菌检测方法有抗酸染色镜检法、细菌培养法等。其中,痰涂片抗酸染色镜检法方法简单、快速,但敏感性较差,每毫升标本中需 5 000~10 000 条菌才能检出。培养法是检测的金标准,但耗时较长,且需要在 P2 实验室开展。

随着分子生物学技术的快速发展,尤其是核酸扩增技术在临床的应用,克服了传统方法的不足,能更快速、敏感、特异地鉴定结核分枝杆菌^[2-3]。Xpert MTB/RIF 试验(Xpert)是美国 Cepheid 开发的全自动结核分枝杆菌检测试剂盒,能在 2 h 内从患者新鲜痰液中直接检出是否含有结核分枝杆菌及是否对利福平耐药。整个过程的手动时间不超过 15 min,而将样品的超声破碎、核酸提取、样品扩增、实时检测融于一体,都在封闭系统中进行,对环境和操作者安全。检测敏感性和特异性高于现有检测方法^[4]。本研究将 Xpert 与常用的检测结核分枝杆菌的荧光定量 PCR 试剂盒、涂片及分枝杆菌培养检测方法进行比较,探讨 Xpert 在结核快速诊断中应用价值,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集 2015-08—2016-02 我院各病区送检的同一患者的 3 份痰标本共计 536 人份。其中 10 例诊断不明确,6 例 Xpert 报错误或无效,12 例仅 MGIT 培养污染,8 例罗氏固体培养污染,3 例为 MGIT 培养与罗氏固体培养均污染,最后纳入统计分析 497 例。在 497 例患者中,370 例诊断为肺结核或结核性胸膜炎,127 例为非肺结核患者(含 10 例非结核分枝杆菌患者,6 例为涂阳)。本研究经武汉市结核病防治所伦理委员会批准。

1.2 主要仪器与试剂

荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司的 ViiA 7 荧光定量 PCR 系统,TB-DNA PCR 检测采用达安基因结核分枝杆菌核酸荧光检测试剂盒。Xpert 检测系统及其配套试剂盒,由美国 Cepheid 公司提供。BACTEC MGIT960 分枝杆菌培养仪及其配套分枝杆菌培养试剂盒由美国 BD 公司提供。

荧光抗酸染色液、酸性和中性罗氏培养液、利福平(RIF)药敏培养液及对硝基苯甲酸(PNB)培养液,购自珠海贝索生物技术公司。

1.3 方法

1.3.1 荧光抗酸染色 按照《结核诊断实验室检验规程》^[5]进行,采用金胺 O 荧光染色法。

1.3.2 分枝杆菌固体培养与比例法药敏 按照《结核诊断实验室检验规程》^[6]进行。痰标本加入等量 4% 的氢氧化钠,振荡静置 20 min,无菌吸管吸 0.1 ml 接种到酸性罗氏培养液上,放 37 °C 培养箱培养,第 3 天及每周观察记录结果,阴性至 56 d。培养阳性菌株进一步做利福平比例法药敏。利福平药物终浓度 40 μg/ml。

1.3.3 BACTEC MGIT960 分枝杆菌培养仪检测

分枝杆菌液体培养检测采用 BACTEC MGIT960 分枝杆菌培养仪进行检测,严格按照操作说明书进行操作。仪器显示阳性标本通过涂片抗酸染色为阳性、革兰染色无杂菌生长、PNB 生长试验为阴性,确定为结核分枝杆菌生长。

1.3.4 结核分枝杆菌荧光定量 PCR 检测(TB-DNA PCR 法) 采用广州达安基因结核分枝杆菌核酸荧光检测试剂盒(TB-DNA PCR 法)。痰液加入 1~4 倍体积 4% NaOH,振荡摇匀,室温下放置 15~30 min 液化,取 1.0~1.5 ml 离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加无菌生理盐水 1 ml 混匀。12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。用 1.0 ml 灭菌水洗涤 1 次,12 000 r/min 离心 5 min。沉淀直接加 50 μl DNA 提取液充分混匀。金属空气浴 10 min(误差不超过 1 min),转至 4 °C 静置 6~8 h,12 000 r/min 离心 5 min 取上清 2 μl 做 PCR 反应。

1.3.5 Xpert 检测 按试剂盒的说明书操作。痰与处理液 1:2 混合,震荡混匀后,处理 15 min。取处理后的标本 2 mL 加入 Xpert 反应试剂盒,将反应试剂盒放入 GeneXpert 仪器,开始测试,自动过滤洗涤样品,自动超声破碎样品,提取、纯化 DNA,水化试剂珠,将样品 DNA 和试剂混合物移入反应管,PCR 循环和实时检测,最后,仪器自动判读结果。Xpert 对 MTB 的结果分为:MTB 检出和未检出。CT 是指探针循环阈值,ΔCT 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,ΔCT>4.0,RIF 耐

药;RIF resistance 未检出,△CT≤4.0,RIF 敏感。

1.4 统计学处理

建立 Excel 表收集实验数据,运用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计数资料采用百分比表示,统计分析采用四格表的 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。2 种方法一致性比较采用 Kappa 检验,Kappa 值 >0.75 为优。

2 结果

2.1 MGIT960 液体培养和罗氏固体培养污染率

MGIT960 液体培养污染率为 2.80% (15/536),罗氏固体培养污染率为 2.05% (11/536),两者均污染的污染率为 0.56% (3/536)。

2.2 5 种方法检测结核分枝杆菌的敏感度与特异度

497 例患者中,370 例确诊为肺结核或结核性胸膜炎,5 种方法的敏感度、特异度、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV) 及准确度 (ACC) 结果

见表 1。

2.3 在肺结核组中,Xpert 与金标准液体培养的比较

以涂片阳性与否进行分层,在 159 例涂片阳性肺结核标本中,Xpert 检出率为 99.37% (158/159),MGIT960 培养检出率为 98.11% (156/159);在 211 例涂片阴性肺结核标本中,Xpert 检出率为 34.60% (73/211),MGIT960 培养检出率为 35.55% (75/211)。无论涂片阳性或涂片阴性标本,Xpert 与金标准 MGIT960 液体培养差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果见表 2。

2.4 Xpert 与比例法利福平药敏结果的一致性

在 220 例 Xpert 检测与培养均阳性的标本中,两者均耐药为 32 例,均敏感为 179 例,Xpert 利福平耐药而比例法敏感为 8 例,Xpert 利福平敏感而比例法耐药为 1 例。2 种方法检测利福平耐药具有高的一致性 (Kappa 值 0.85)。结果见表 3。

表 1 5 种结核分枝杆菌检测方法的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及准确度

检测方法	肺结核组 (n=370)		非肺结核组 (n=127)		敏感度/%	特异度/%	PPV	NPV	ACC
	阳性	阴性	阳性	阴性					
荧光涂片	159	211	6	121	42.97	95.27	96.36	36.45	56.34
TB-DNA PCR	213	157	1	126	57.57	99.21	99.53	44.52	68.21
Xpert	231	139	2	125	62.43	98.42	99.14	47.35	71.63
罗氏培养	202	168	14	113	54.59	88.97	93.52	40.21	63.38
MGIT960	231	139	15	112	62.43	88.19	93.90	44.62	69.01

表 2 在涂片阳性和涂片阴性肺结核患者中 Xpert 与金标准液体培养的比较

涂片性质	Xpert		MGIT960		χ^2	P 值
	阳性	阴性	阳性	阴性		
涂片阳性 (n=159)	158	1	156	3	1.013	0.314
涂片阴性 (n=211)	73	138	75	136	0.042	0.838
合计	231	139	231	139	0.000	1.000

表 3 Xpert 与比例法利福平药敏结果的一致性

Xpert 法利福平药敏	比例法利福平药敏		合计	Kappa 值
	耐药	敏感		
耐药	32	8	40	0.85
敏感	1	179	180	
合计	33	187	220	

3 讨论

目前我国仍是全球 30 个结核病高负担国家之一,每年新发结核病患者约 90 万例,位居全球第 3 位。细菌学检测是诊断的金标准,但传统的检测方

法已不能满足临床快速诊断的需求。本研究采用 5 种不同的方法检测痰标本中结核分枝杆菌,以临床综合诊断为标准,结果显示 Xpert 诊断结核的敏感度为 62.43%,与金标准 MGIT960 的敏感度 62.43% 一致,比涂片、罗氏培养和常规的 TB-DNA PCR 法分别高 19.46%、7.84% 和 4.86%。而且在涂片阳性肺结核中,检出率为 99.37%,涂阴肺结核检出率为 34.60%,说明 Xpert 具有较高的敏感性,尤其在涂阴标本的检测上,但于熊宗年等^[6]的报道比较,可能与患者来源不同有关。

在 MGIT960 培养检出的 15 株非结核分枝杆菌 (NTM) 中,有 6 例涂片阳性,Xpert 检测均为阴性,说明 Xpert 对结核分枝杆菌有高的特异性,但同时也提示对于涂阳而 Xpert 阴性的标本应高度怀疑 NTM,需要临床进一步做与 NTM 相关的检测和菌种鉴定^[7]。

Xpert 在检测利福平耐药中,与金标准比例法的符合率为 95.91% (Kappa 值 0.852),有较高的一致性。在 8 例 Xpert 检出耐药而表型为敏感的标本中,有 2 例为菌量为极低,可能导致痰标本与药敏所用的培养菌株的结果不一致;另 6 例可能为沉默突变或与低度耐药相关的突变有关^[8-9]。1 例

为 Xpert 为敏感而表型为耐药,可能与利福平耐药决定区之外的突变或异质性耐药有关^[10-11]。

Xpert 在诊断结核病时,同时获得利福平耐药,具有操作简便、快速、安全、敏感和特异的优点,但还存在一定的局限性。①Xpert 具有相对较高的成本,对于经济不发达地区,结核患者可能较难承担此项检测费用。②对于涂阴培阴患者,还需要结合临床进行综合诊断。虽然存在一定的不足,但对于快速筛查利福平耐药及可疑耐多药结核病,诊断结核和控制耐药结核病的传播具有重要的临床价值。

参考文献

- [1] World health organization. Global tuberculosis report 2017[M]. Geneva, Switzerland: WHO, 2017: 262.
- [2] Reed JL, Walker ZJ, Basu D, et al. Highly sensitive sequence specific qPCR detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens[J]. *Tuberculosis*(Edinb), 2016, 101: 114—124.
- [3] Liu D, Zhao B, Ou X, et al. A novel isothermal amplification-based method to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *J Microbiol Methods*, 2018, 145: 59—65.
- [4] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363: 1005—1015.
- [5] 赵雁林, 逢宇. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [6] 熊宗年, 张雪芹, 陈艳. T-SPOT. TB 和 GeneXpert-MTB/RIF 检测在结核诊断中的应用[J]. *临床血液学杂志*, 2017, 30(5): 777—780.
- [7] 中华医学会结核病学分会, 非结核分枝杆菌病实验室诊断专家共识编写组. 非结核分枝杆菌病实验室诊断专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(6): 438—443.
- [8] Rahman A, Sahrin M, Afrin S, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF Assay and GenoType MTBDRplus DNA Probes for Detection of Mutations Associated with Rifampicin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0152694.
- [9] Pandey P, Pant ND, Rijal KR, et al. Diagnostic Accuracy of GeneXpert MTB/RIF Assay in Comparison to Conventional Drug Susceptibility Testing Method for the Diagnosis of Multidrug-Resistant Tuberculosis[J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0169798.
- [10] Tan Y, Hu Z, Zhao Y, et al. The beginning of the *rpoB* gene in addition to the rifampin resistance determination region might be needed for identifying rifampin/rifabutin cross-resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Southern China[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50: 81—85.
- [11] Zetola NM, Shin SS, Tumedí KA, et al. Mixed *Mycobacterium tuberculosis* complex infections and false-negative results for rifampin resistance by GeneXpert MTB/RIF are associated with poor clinical outcomes[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52: 2422—2429.

(收稿日期: 2018-06-23)