

Xpert MTB/RIF 系统检测儿童肺结核灌洗液标本结果分析

牛 波¹, 刘建华¹, 曹丽洁¹, 帅金凤¹, 池跃朋²

(1. 河北省儿童医院 呼吸二科, 河北 石家庄 050000; 2. 河北省胸科医院 二病区, 河北 石家庄 050000)

【摘要】目的: 应用 Xpert MTB/RIF 系统对儿童肺结核灌洗液标本进行结核分枝杆菌与利福平耐药基因检测并探讨其应用价值。方法: 收集河北省儿童医院和河北省胸科医院临床确诊为肺结核患儿的 126 份灌洗液标本, 分别行罗氏培养基结核分枝杆菌培养、药物敏感性试验和 Xpert MTB/RIF 系统检测。结果: Xpert MTB/RIF 系统检测需要 2 h 左右, 其结核分枝杆菌检出率为 59.52% (75/126); 在 28 份培养阳性标本中, Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌的敏感度为 96.43% (27/28); 在 98 份培养阴性标本中, Xpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌的敏感度为 48.98% (48/98); Xpert MTB/RIF 系统利福平耐药性检测的敏感度为 100.00% (2/2)。结论: Xpert MTB/RIF 系统是一种快速、简便、阳性率高且能够同时检测利福平耐药性情况的检测技术, 具有较高的临床应用价值。

【关键词】结核分枝杆菌; 利福平; Xpert MTB/RIF 系统

【中图分类号】R 725.1 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2016.02.010

Assessment of Xpert MTB/RIF assay for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance in bronchoalveolar lavage fluid of children with pulmonary tuberculosis

NIU Bo, LIU Jianhua, CAO Lijie, SHUAI Jinfeng, CHI Yuepeng

Department of Respiratory Diseases, Hebei Provincial Children's Hospital, Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】Objective: To assess the performance of the Xpert MTB/RIF system in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from children with pulmonary tuberculosis. **Methods:** 126 BALF specimens obtained from the children clinically diagnosed as pulmonary tuberculosis respectively in the Children's Hospital of Hebei and Hebei Chest Hospital, were subjected to culturing in Lowenstein-Jensen medium, test of drug sensitivity and Xpert MTB/RIF assay. **Results:** The mean run time of Xpert MTB/RIF system was about 2 hours, and its sensitivity was 59.52% (75/126). In 28 positive cultures and 98 negative cultures, the sensitivity of the Xpert MTB/RIF assay was 96.43% (27/28) and 48.98% (48/98), respectively. In addition, Xpert MTB/RIF had a sensitivity of 100.00% (2/2) in determination of rifampicin resistance. **Conclusion:** The Xpert MTB/RIF is of great clinical value for it is a rapid, convenient and accurate tool to detect the *Mycobacterium tuberculosis* as well as rifampicin resistance based on BALF specimens from children with pulmonary tuberculosis.

【Key words】*Mycobacterium tuberculosis*; rifampin; Xpert MTB/RIF system

基金项目: 河北省卫生厅重大专项(20130397)

收稿日期: 2015-06-16

作者简介: 牛 波 (1978-), 女, 主治医师 (电话) 13833132393 (电子信箱) 24201475@qq.com;

池跃朋, 男, 主治医师 (电子信箱) chiyeupeng2013@163.com 通讯作者.

[17] CAROOM C, TULLAR JM, BENTON EG Jr *et al.* Intrawound vancomycin powder reduces surgical site infections in posterior cervical fusion [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013 38: 1183 - 1187.

[18] TUBAKI VR, RAJASEKARAN S, SHETTY AP. Effects of using intravenous antibiotic only versus local intrawound vancomycin antibiotic powder application in addition to intravenous antibiotics on postoperative infection in spine surgery in 907 patients [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* 2013 38(25): 2149 - 2155.

[19] KHAN NR, THOMPSON CJ, DECUYPERE M *et al.* A meta-analysis of spinal surgical site infection and vancomycin powder [J]. *J Neurosurg Spine* 2014 21(6): 974 - 983.

[20] BAKHSHESHIAN J, DAHDALEH NS, LAM SK *et al.* The use of vancomycin powder in modern spine surgery: systematic review and meta-analysis of the clinical evidence [J]. *World Neurosurg* 2015, 83(5): 816 - 823.

[21] LÓPEZ M, MOLINA M. Should we add vancomycin antibiotic powder to prevent post operative infection in spine surgery [J]? *Medwave* 2015, 15(5): e6160.

[22] MARTIN JR, ADOGWA O, BROWN CR *et al.* Experience with intrawound vancomycin powder for posterior cervical fusion surgery [J]. *J Neurosurg Spine* 2015 22(1): 26 - 33.

近些年由于艾滋病等免疫低下疾病增多、结核分枝杆菌耐药性增强以及防控体系的不完善等现状,全球结核病疫情已不容乐观。儿童是结核病的易感人群,2013 年全球有 900 万人罹患结核病,约 55 万例为儿童^[1]。肺结核患儿痰标本不易留取,通过纤维支气管镜技术留取灌洗液可提高诊断率,但仍不理想,延误治疗的情况十分常见。随着诊断技术的发展,Xpert MTB/RIF 系统的出现受到国内外广泛关注。Boehme 等^[2]研究表明该技术灵敏度和特异度高、省时、操作简便、应用前景好。本研究对 Xpert MTB/RIF 系统在儿童肺结核结核分枝杆菌及利福平耐药性诊断中的检测效率及临床价值进行探讨。

1 对象和方法

1.1 研究对象 选择河北省儿童医院和河北省胸科医院 2013 年 6 月~2015 年 3 月收治的临床诊断为肺结核的初诊患儿 126 例,均无抗结核治疗史,入组患儿的诊断均符合儿童肺结核临床诊断标准^[3],行纤维支气管镜检查前,痰涂片抗酸染色三次检查阴性或无痰。所有患儿均符合儿科支气管镜术指南^[4]中的检查适应证,家属均签署了知情同意书。

1.2 试剂 抗酸染色液、罗氏固体培养基及药敏试剂(珠海贝索生物技术有限公司生产);Xpert MTB/RIF 检测仪及试剂盒(美国 Cepheid 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本留取 Olympus P260F 纤维支气管镜检查前,7 岁以下儿童采用异丙酚静脉复合麻醉,7 岁以上儿童采用利多卡因气管内黏膜表面麻醉。患儿取仰卧位,纤维支气管镜经鼻腔进入,检查各部分病变情况后,在病灶部位经导管注入适量生理盐水,收集灌洗液。取出部分灌洗液分为 2 份,1 份用于罗氏培养,1 份用于 Xpert MTB/RIF 检测,剩余灌洗液冻存备用。

1.3.2 结核分枝杆菌罗氏培养及比例法药敏试验 按照结核病诊断实验室检验规程^[5]进行。

1.3.3 Xpert MTB/RIF 检测 灌洗液标本中加入消化液,使其与灌洗液比例为 1:1(v/v),拧紧盖子,剧烈摇动数次。室温放置 15 min,待混合液中无可见成分时,吸取 2 mL 混合液加入 Xpert MTB/RIF 反应试剂盒中,然后将反应盒放入 4 通道 Gene Xpert 平台中自动运行 2 h 左右,系统可显示出结核分枝杆菌检测结果及利福平耐药情况。详细过程按说明书进行。试验采用盲法,即 Xpert MTB/RIF 检测和

培养药敏试验分别由不同的工作人员来完成。

1.4 统计学方法 分别计算两种方法的阳性率,采用 SPSS 19.0 软件对数据进行分析,两种方法间的比较采用配对 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗氏培养与 Xpert MTB/RIF 系统结核分枝杆菌检测 126 例灌洗液标本中罗氏培养阳性 28 例(22.22%),Xpert MTB/RIF 系统结核分枝杆菌检出 75 例(59.52%);28 份培养阳性标本中,Xpert MTB/RIF 系统结核分枝杆菌检出 27 例(96.43%);98 份培养阴性标本中,Xpert MTB/RIF 系统结核分枝杆菌检出 48 例(48.98% 表 1)。Xpert MTB/RIF 系统结核分枝杆菌检测阳性率高于罗氏培养法,差异有统计学意义(配对 $\chi^2 = 45.08, P < 0.001$ 表 2)。本研究因没有非结核分枝杆菌作为对照组,因此不对 Xpert MTB/RIF 系统的特异性进行评价。

表 1 罗氏培养法与 Xpert MTB/RIF 系统结核分枝杆菌检测结果比较

方法	阳性	阴性
罗氏培养	28	98
Xpert MTB/RIF 系统	75	51

表 2 两种方法检测结果统计学比较

罗氏培养法	Xpert MTB/RIF 系统检测		合计
	+	-	
+	27	1	28
-	48	50	98
合计	75	51	126

配对 $\chi^2 = 45.08, P < 0.001$ 。

2.2 Xpert MTB/RIF 系统检测次数对结果的影响

罗氏培养阳性而 Xpert MTB/RIF 系统首次检测为阴性的有 2 例标本,对其再次进行检测,其中 1 例为阳性,灵敏度由 92.86% 上升到 96.43%。

2.3 两种方法利福平耐药检测情况 28 例培养阳性标本,其中比例法药敏试验显示利福平耐药菌株 2 株,耐药率为 7.14% (2/28);比例法耐药的患者的标本中,Xpert MTB/RIF 系统检出耐药株 2 例,灵敏度为 100.00% (2/2);比例法敏感菌中,Xpert MTB/RIF 系统检测为耐药 1 例,特异度为 96.15% (25/26)。

3 讨论

随着抗结核药物的发现,结核病的预后有了极大改善,然而,耐药结核分枝杆菌日益增多,新药物研发滞后的情况,给结核病的防治工作带来了极大挑战。耐药肺结核治愈后容易复发,化疗周期长,使儿童肺结核的诊治较成人更为复杂,及时诊断并按药敏试验结果进行化疗对有效治疗儿童肺结核至关重要。当今,罗氏培养法及药敏试验结果可靠,是诊断耐药结核病的“金标准”。但是培养需要4~8周,药敏试验需要4周左右,很多患者由于不能及时诊治而延误治疗,造成患者预后不佳甚至死亡。

Xpert MTB/RIF 检测系统是一种采用巢式 PCR 技术,以利福平耐药相关 *rpoB* 基因为靶基因,可在2 h 左右同时检测结核分枝杆菌和利福平耐药性的自动化、全封闭检测平台^[6]。巢式 PCR 的应用使其敏感性提高了2~3个数量级,同时减少了非特异性扩增。由于大多数利福平耐药的结核分枝杆菌同时存在异烟肼耐药,在一定程度上利福平耐药情况可作为耐多药结核病的监测指标^[7]。近年来,Xpert MTB/RIF 系统应用于各种临床标本,成为 WHO 推荐使用的诊断技术^[8-9]。

本研究采用 Xpert MTB/RIF 检测系统可以发现96%以上的经灌洗液培养证实的肺结核患儿。经临床症状、影像学高度怀疑为肺结核的患儿,但培养阴性的标本中,阳性率可达48.98%以上,明显提高了小儿肺结核的诊断效率和鉴别诊断的能力。在 Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药性方面,其敏感度与特异度分别为100.00%与96.15%。敏感度达到100.00%可能和样本数较少有关,此系统利福平耐药相关 *rpoB* 基因的检测是根据 *rpoB* 耐药决定区的81 bp 范围内序列设计了5对探针并标记不同的荧光基团,以实现 MTB 野生株在5个探针对应位置的扩增,突变株不能被扩增出,该系统没有覆盖所有的突变位点。Nicol 等^[10]用 Xpert MTB/RIF 技术对南非年龄 < 15 岁结核病儿童的检测结果显示灵敏度为74.0%,远低于 FIND 基金会对成人调查的98.2%^[11],此研究对126例患儿灌洗液检测的敏感度为59.52%,其结果较成人低的原因可能与患儿标本量少、标本合格率低、含菌量较少有关。有两个标本第一次没有得出结果,可能是标本未处理好、质量控制出现了问题或试剂盒不合格,从而影响了

DNA 扩增。另外,Xpert MTB/RIF 系统检出时间在2 h 左右,检测过程在密闭系统中自动完成,不仅快速,而且还降低了生物安全的风险。

综上所述,Xpert MTB/RIF 检测系统快速、简便、阳性率高,在儿童结核病的早期诊断和利福平耐药评估方面优于传统的罗氏培养和比例法药敏实验,对早期诊疗具有积极影响,在医疗系统和疾控部门具有良好的应用前景。

【参考文献】

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2014 [EB/OL]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en.
- [2] BOEHME CC, NABETA P, HILLEMANN D, *et al*. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance [J]. *N Engl J Med* 2012, 363(11): 1005-1015.
- [3] 中华医学会呼吸学组. 儿童肺结核的临床诊断标准和治疗方案 [J]. *中华儿科杂志* 2006, 44(4): 249-251.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿科支气管镜术指南(2009版) [J]. *中华儿科杂志* 2009, 47(10): 740.
- [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 [M]. 北京: 中国教育文化出版社 2006: 49-51.
- [6] 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.
- [7] MOKROUSOV I, OTTEN T, VYSHNEVSKIY B, *et al*. Allele-specific *rpoB* PCR assay for detection of Rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum smears [J]. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47(7): 2231-2235.
- [8] BOEHME CC, NICOL MP, NABETA P, *et al*. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study [J]. *Lancet* 2011, 377(9776): 1495-1505.
- [9] VADWAI V, BOEHME C, NABETA P, *et al*. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]? *J Clin Microbiol* 2011, 49(7): 2540-2545.
- [10] NICOL MP, WORKMAN L, ISAACS W, *et al*. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study [J]. *Lancet Infect Dis* 2011, 11(11): 819-824.
- [11] HILLEMANN D, RUSCH-GERDES S, BOEHME C, *et al*. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated Gene Xpert MTB/RIF system [J]. *J Clin Microbiol* 2011, 49(4): 1202-1205.