

线性探针技术在耐多药结核病诊断中的应用评价

杨 健^{1,2}, 庄贵华^{1△}, 王西娣², 陈美玲², 李 妍², 王 蕊² (1. 西安交通大学医学部公共卫生学院, 西安 710061; 2. 陕西省结核病防治研究所结核病参比实验室, 西安 710048)

【摘要】 目的 评价线性探针技术诊断临床耐多药结核病(MDR-TB)的价值。**方法** 收集临床分离的结核分枝杆菌菌株 268 例, 采用比例法药敏试验和线性探针技术检测利福平和异烟肼的耐药性, 以比例法药敏试验为金标准, 分析线性探针方法检测的敏感度、特异度。**结果** 与比例法药敏试验相比, 线性探针技术检测耐利福平敏感度为 88.89%, 特异度为 98.05%, 耐药检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.82, P>0.05$); 耐异烟肼敏感度为 84.61%, 特异度为 97.69%, 耐药检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.69, P>0.05$); 诊断 MDR-TB 的敏感度为 78.26%, 特异度为 96.85%, 耐多药检出率差异无统计学意义($\chi^2=0.53, P>0.05$)。**结论** 线性探针技术敏感度和特异度高, 可用于 MDR-TB 的早期诊断。

【关键词】 结核分枝杆菌; 耐多药结核病; 线性探针技术; 药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)10-1336-03

Application and evaluation of line probe assay in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis YANG Jian^{1,2}, ZHUANG Gui-hua^{1△}, WANG Xi-di², CHEN Mei-ling², LI Yan², WANG Rui² (1. School of Public Health, Department of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 2. Tuberculosis Reference Laboratory, Shaanxi Provincial Institute for Tuberculosis Control and Prevention, Xi'an, Shaanxi 710048, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of line probe assay in the diagnoses of multidrug-resistant tuberculosis(MDR-TB). **Methods** 268 strains of clinically isolated M. tuberculosis were collected. The ratio method drug susceptibility test and line probe assay were adopted for detecting the resistance of rifampin(RFP) and isoniazid(INH). Using the ratio method of the drug susceptibility test as gold standard, the sensitivity and specificity of line probe assay were analyzed and compared with those by the traditional drug susceptibility test. **Results** Compared with the ratio method drug susceptibility test, the sensitivity and specificity of the line probe assay were 88.89% and 98.05% for detecting RIF resistance and 84.61% and 97.69% for detecting INH resistance, respectively, there was no statistically significant difference between the two methods($\chi^2=0.82, P>0.05$; $\chi^2=0.69, P>0.05$). The sensitivity and specificity of line probe assay for diagnosing MDR-TB detecting were 78.26% and 96.85% respectively, the difference in multiple drug resistance rate had no statistical significance($\chi^2=0.53, P>0.05$). **Conclusion** The line probe assay is a reliable method with high sensitivity and high specificity and can be used for the early diagnosis of MDR-TB.

【Key words】 M. tuberculosis; multidrug resistance tuberculosis; line probe assay; drug susceptibility test

我国是全球第 2 大结核病高负担国家, 患病人群数量巨大, 面临着严峻的结核病流行趋势, 同时也是全球 27 个耐药结核病高负担国家之一, 耐多药结核病(MDR-TB, 至少对异烟肼和利福平同时耐药的结核病)患病人数高居全球第 1 位^[1-2]。目前传统药敏试验仍然是诊断 MDR-TB 常用的细菌学诊断工具, 但此方法耗时较长, 难以实现对结核病患者的早期正确诊断和治疗^[3-4], 因此亟须一种更快速和更可靠的实验室诊断方法辅助临床诊断。随着分子生物学诊断技术的不断发展, 线性探针技术作为一种快速检测结核菌对异烟肼和利福平是否耐药的技术, 已被世界卫生组织认可^[5], 近年来逐步应用于我国结核病实验室, 而目前陕西地区较少见关于应用此技术诊断 MDR-TB 价值评估的相关报道。为了进一步验证线性探针技术快速诊断 MDR-TB 在本地区结核病防治工作中的可行性, 笔者选取 268 例临床分离结核分枝杆菌菌株, 以比例法药敏试验为金标准, 评价应用线性探针技术诊断 MDR-TB 的价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取 2013~2015 年陕西省结核病防治研究所临床患者痰液标本中分离的结核分枝杆菌菌株 268 例。

1.2 仪器与试剂 仪器: 生物安全柜、博日 Lifetouch 基因扩增仪、Twincubator 杂交仪、金属浴、超声破碎仪、离心机、移液器(1 000、200、10 μ L)。试剂: 引物/核苷酸混合物 PNM, 热启动 Taq 酶试剂盒, Genotype 耐多药试剂盒(德国 Hain life science 公司, 批号 IS00153), 无菌去离子水。分枝杆菌药敏罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司, 批号 15100901)。结核分枝杆菌标准株(H37Rv)由中国疾病预防控制中心结核病临床防治中心国家参比实验室提供。

1.3 方法

1.3.1 线性探针检测 参照文献[6]中的标准化操作程序进行。DNA 提取: 使用接种环取一环培养物于 1.5 mL 离心管中, 每管加 300 μ L 无菌去离子水, 涡旋振荡重悬。95 $^{\circ}$ C 金属浴孵育 20 min, 超声裂解 15 min, 12 000 \times g 离心 5 min, 将上

清液转移到新的 1.5 mL 离心管。PCR 扩增:扩增体系采用 50 μ L 反应体系,5 μ L DNA 模板,35 μ L PNM,5 μ L 10 \times PCR 缓冲液,2 μ L MgCl₂,0.2 μ L Taq 酶,3 μ L 去离子水。反应条件:95 $^{\circ}$ C 15 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 2 min 10 个循环,95 $^{\circ}$ C 25 s,53 $^{\circ}$ C 40 s,70 $^{\circ}$ C 40 s 20 个循环,70 $^{\circ}$ C 8 min,4 $^{\circ}$ C 1 h。杂交:每个槽的一角加 20 μ L 变性试剂(DEN)及加 20 μ L PCR 产物室温孵育 5 min,每个槽加 1 mL 45 $^{\circ}$ C 预热的杂交缓冲液(HYB),放入标记好的探针试条,45 $^{\circ}$ C 杂交仪孵育 30 min,吸出 HYB,加 1 mL 漂洗液(STR),45 $^{\circ}$ C 杂交仪孵育 15 min,吸出 STR,加入 1 mL 漂洗液(RIN)漂洗 1 min,倒掉 RIN,加入 1 mL 按 1:100 的比例稀释标记物(CON-C)室温孵育 30 min,加入 1 mL RIN 漂洗 2 次,蒸馏水 1 mL 漂洗 1 次,每次 1 min,倒掉洗液,加入 1 mL 按 1:100 的比例稀释底物(SUB-C)室温孵育 10 min。加 1 mL 蒸馏水洗 2 次。结果判读如下,耐药:野生条带(WT)缺失或突变条带(MUT)出现;敏感:所有 WT 条带都出现且所有 MUT 条带都缺失;结核分枝杆菌复合群(TUB):TUB 条带出现;未检测到结核分枝杆菌:TUB 条带缺失。

1.3.2 比例法药物敏感试验 参照文献[7]中的标准化操作程序进行。用接种环刮取新鲜菌落,研磨后与标准麦氏比浊管比浊,得到 1 mg/mL 的菌液;稀释成 2~10 mg/mL 和 4~10 mg/mL 菌液;用 22 SWG 标准接种环分别取 1 满环(即 0.01 mL)菌液,用划线法均匀接种至对照及含药培养基表面(药物浓度:利福平 40 μ g/mL,异烟肼 0.2 μ g/mL),直立放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱内培养,4 周后报告结果。结果判读:耐药百分比=(含药培养基上生长的菌落数/对照培养基上生长的菌落数) \times 100%。若耐药百分比<1%者则为敏感株, \geq 1%者则认为受试菌对该药耐药。

1.4 质量控制 实验室技术人员均持有临床基因扩增检验技术资格证;参加国家结核病控制中心参比实验室开展的药敏试验测试,并通过质控考核。所有操作步骤严格按照标准化操作步骤进行,对于检验失败的样本进行重复试验。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,比较两种检测方法的敏感度、特异度、约登指数、阳性预测值、阴性预测值、95% CI,判断耐药检出率差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检测 MDR-TB 情况 线性探针技术检测和比例法药敏试验 MDR-TB 检出率分别为 16.04%(43/268)和 17.16%(46/268),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.12, P > 0.05$)。

2.2 两种方法检测利福平和异烟肼的结果比较 线性探针检测结果分析:268 例菌株中 60 例为利福平耐药,耐药率为 22.39%(60/268);49 例为异烟肼耐药,耐药率为 18.28%(49/268)。比例法药敏试验检测结果分析:63 例为利福平耐药,耐药率为 23.51%(63/268);52 例为异烟肼耐药,耐药率为 19.40%(52/268)。见表 1、2。以比例法药敏试验为金标准,检测耐利福平敏感度为 88.89%(95% CI: 81.13%~96.65%),特异度为 98.05%(95% CI: 96.16%~99.94%),约登指数为 0.869 4(95% CI: 0.789 5~0.949 3),阳性预测值为 93.33%(95% CI: 87.02%~99.64%),阴性预测值为 96.63%(95% CI: 94.18%~99.08%),耐药检出率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.82, P > 0.05$);耐异烟肼敏感度为 84.61%(95% CI: 74.81%~94.41%),特异度为 97.69%(95% CI: 95.69%~

99.69%),约登指数为 0.823 0(95% CI: 0.723 0~0.923 0),阳性预测值为 89.80%(95% CI: 80.87%~98.73%),阴性预测值为 96.79%(95% CI: 94.46%~99.12%),耐药检出率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.69, P > 0.05$)。

表 1 两种方法对利福平耐药性的检测结果比较(n)

线性探针	比例法药敏试验		合计
	耐药	敏感	
耐药	56	4	60
敏感	7	201	208
合计	63	205	268

表 2 两种方法对异烟肼耐药性的检测结果比较(n)

线性探针	比例法药敏试验		合计
	耐药	敏感	
耐药	44	5	49
敏感	8	211	219
合计	52	216	268

2.3 两种方法检测 MDR-TB 结果比较 以比例法药敏试验为金标准,诊断 MDR-TB 的敏感度为 78.26%(95% CI: 66.34%~90.18%),特异度为 96.85%(95% CI: 94.55%~99.15%),约登指数为 0.751 1(95% CI: 0.625 4~0.876 8),阳性预测值为 83.72%(95% CI: 72.69%~94.75%),阴性预测值为 95.56%(95% CI: 89.40%~100.00%),耐多药检出率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.53, P > 0.05$),见表 3。

表 3 两种方法检测 MDR-TB 的结果比较(n)

线性探针	比例法药敏试验		合计
	MDR-TB	非 MDR-TB	
MDR-TB	36	7	43
非 MDR-TB	10	215	225
合计	46	222	268

3 讨 论

快速耐药诊断可以为 MDR-TB 的早期治疗提供科学依据。线性探针技术基于多重 PCR 扩增,扩增产物通过反向杂交技术与预先固化在试纸条上的特异性探针杂交,通过杂交条带的显色情况来判定结核分枝杆菌对利福平和异烟肼的耐药性,可在 24 h 内获得检测结果,与常规比例法药敏试验(4 周)相比,缩短了药敏结果的报告时间[8]。在欧美等发达国家,该技术在临床或科研中已得到广泛应用,目前已通过中国食品药品监督管理局批准可直接用于临床。

本研究结果显示线性探针耐多药技术检测与传统药敏试验比较,检测耐利福平敏感度为 88.89%,特异度为 98.05%;耐异烟肼敏感度为 84.61%,特异度为 97.69%,与国内李强等[9]报道耐利福平敏感度(88.49%)、特异度(97.17%)接近,高于耐异烟肼敏感度(77.78%),而特异度(97.69%)相同。与国外 Mitarai 等[10]报道耐利福平敏感度(98.9%)、特异度(97.3%),耐异烟肼敏感度(90.6%),特异度(100.0%)相比,本研究的敏感度较低,特异度相近,可能与不同国家和地区流行的菌株不同有关。本研究结果表明对耐多药菌株的敏感度

为 78.26%，特异度为 96.85%，约登指数为 0.751 1，高于文献 [9] 报道的敏感度 (74.51%)，而特异度 (98.51%) 相近，表明线性探针技术在陕西地区具有较好的适用性。在敏感度和特异度保持不变的情况下，阳性预测值会随着人群耐药率的增高而增高，本研究人群中利福平、异烟肼耐药率及耐多药率相对较高 (23.51%，63/268)、(19.40%，52/268)、(17.16%，46/268)，其阳性预测值分别为 93.33%、89.80%、83.72%，因耐多药检测结果的准确性影响着患者治疗方案的选择，将线性探针技术应用与耐多药高危人群的诊断将更有意义。本研究结果表明线性探针技术对 MDR-TB 具有较高的诊断价值

MDR-TB 是当前陕西地区结核病控制的重点，线性探针耐多药检测技术的敏感性和特异性高，检测时间短，为 MDR-TB 的早期诊断和治疗提供了可能。应用新的快速耐药检测技术，将对陕西地区未来 MDR-TB 控制具有重要意义。此外开展线性探针耐多药检测技术需要建立标准临床基因扩增实验室，对实验室人员技术水平的要求也相对较高^[11]，鉴于本地区各级结核病实验室的基本情况，与县区级结核病实验室相比，该项技术更适合在地市级及以上的结核病实验室应用。

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. 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] Prasad R, Gupta N, Singh M. Multidrug resistant tuberculosis: trends and control [J]. Indian J Chest Dis Allied Sci, 2014, 56(4): 237-246.

[3] 张贺秋, 赵雁林. 现代结核病诊断技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 3-5.

[4] Ezati N, Lukoye D, Wampande EM, et al. The Mycobacterium tuberculosis Uganda II family and resistance to

first-line anti-tuberculosis drugs in Uganda [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1): 703.

[5] Ali IF, Babak F, Fazlollah MS, et al. Rapid detection of MDR-Myco bacterium tuberculosis using modified PCR-SSCP from clinical Specimens [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2014, 4(1): 165-170.

[6] 赵雁林. 结核病实验室诊断技术培训教程 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 184-188.

[7] 赵雁林, 王黎霞. 结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化操作程序及质量保证手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 25.

[8] Imperiale BR, Di Giulio AB, Adrián Cataldi A, et al. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis cross-resistance to isoniazid, rifampicin and levofloxacin with their respective structural analogs [J]. J Antibiot (Tokyo), 2014, 67(11): 749-754.

[9] 李强, 欧喜超, 夏辉, 等. Genotype MTBDR plus 快速耐药诊断方法在地市级结核病医院应用的评估研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2013, 14(1): 35-38.

[10] Mitarai S, Kato S, Ogata H, et al. Comprehensive multi-center evaluation of a new line probe assay kit for identification of Mycobacterium species and detection of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 844-890.

[11] 李强, 夏辉, 欧喜超, 等. 应用线性探针技术与传统药敏试验检测耐药结核病的成本比较 [J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(3): 187-190.

(收稿日期: 2015-10-20 修回日期: 2015-12-28)

(上接第 1335 页)

者血清中 ACA 水平随着视网膜微血管病变的进展而升高，增殖期视网膜病变的糖尿病患者 ACA 水平升高更为显著，提示 ACA 可能参与 DR 发病过程，ACA 进行性增高可能预示 DR 进展程度，对判断病情有一定参考价值。

综上所述，本研究结果显示 HbA1c、FBG、hs-CRP、ACA 的水平变化与 DR 的严重程度密切相关，检测这些指标对临床及糖尿病并发症早期预防、治疗和风险评估有重要意义。

参考文献

[1] 赵冬, 王旭红. IFG、IGT、IGR 患者血清高敏 C 反应蛋白及胰岛素抵抗指数变化的临床研究 [J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21(4): 333-335.

[2] 杜志强, 郝斌, 曹文东, 等. 抗磷脂抗体促血栓形成的机制 [J]. 中日友好医院学报, 2011, 25(4): 244-246.

[3] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 797-798.

[4] Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scale [J]. Ophthalmology, 2003, 110(9): 1677-1682.

[5] 陈刚, 俞茂华, 夏燕萍. 老年糖尿病患者 GAD 抗体检测的

意义 [J]. 中国老年保健医学, 2007, 5(4): 5-7.

[6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 2013 年版 [J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 7(6): 47-49.

[7] 盛志新, 谢丹红. 炎症与 2 型糖尿病的关系 [J]. 新医学, 2008, 39(5): 345-347.

[8] 谢驰, 张兴兵, 方严. C 反应蛋白、糖化血红蛋白与 2 型糖尿病视网膜病变的关系 [J]. 临床眼科杂志, 2011, 19(2): 130-132.

[9] 王伟超, 张洁, 王虹, 等. 社区中老年糖尿病视网膜病变患者泪液 IL-6 与血液 HbA1c 关系分析 [J]. 实用医学杂志, 2015, 31(18): 3081-3087.

[10] 徐晓鹤, 陈晓隆, 刘鹤南. 炎症反应及细胞因子与糖尿病视网膜病变 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(11): 2163-2164.

[11] 张弛, 徐劲, 张鹏飞. 同型半胱氨酸、抗心磷脂抗体与脑血栓形成的相关性研究 [J]. 安徽医学, 2011, 32(2): 146-148.

[12] 兰文, 陆燕, 王春红, 等. 糖尿病视网膜病变炎症的研究新进展 [J]. 眼科新进展, 2013, 33(2): 197-200.

[13] 马云青, 吴冬科. 老年 2 型糖尿病患者抗心磷脂抗体水平变化及意义 [J]. 山东医药, 2009, 49(44): 50-51.

(收稿日期: 2015-12-11 修回日期: 2016-01-24)