

核酸检测实验室研究 · 论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.15.002

## 线性探针技术诊断耐多药结核病的临床应用价值研究\*

班立芳<sup>1</sup>, 刘建民<sup>2</sup>, 孔庆飞<sup>1△</sup>, 马海鸣<sup>1</sup>, 王彦淇<sup>1</sup>, 李峰<sup>1</sup>, 李小龙<sup>3</sup>

河南省郑州市第六人民医院:1. 检验科;2. 结核病科;3. 感染管理科, 河南郑州 450015

**摘要:**目的 探讨线性探针技术诊断耐多药结核病的临床应用价值。方法 选取 2017 年 1 月至 2019 年 2 月在该院就诊的 247 例涂阳结核病患者为研究对象, 采集晨起痰标本后 3 d 内依次完成药敏试验和线性探针技术检测, 以药敏试验检测结果作为诊断的“金标准”, 应用灵敏度、特异度、准确性和约登指数评价线性探针技术的诊断价值。结果 线性探针技术对异烟肼耐药性(53 例, 21.46%)、利福平耐药性(60 例, 24.29%)及耐多药结核病(50 例, 20.24%)的检出率与传统药敏试验比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。线性探针技术对异烟肼耐药性、利福平耐药性及耐多药结核病检测的灵敏度(88.89%、88.52%、84.62%)、特异度(97.41%、96.77%、96.92%)、准确性(95.55%、94.74%、94.33%)及约登指数(0.863、0.853、0.815)均较高。结论 线性探针技术对耐多药结核病检测的灵敏度、特异度及准确性均较高, 且检测所需时间短, 对于耐多药结核病的早期诊断具有重要意义。

**关键词:**耐多药结核病; 线性探针技术; 药敏试验; 诊断价值

中图分类号:R446.5;R52

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)15-2116-03

### The clinical application value of line probe assay in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis\*

BAN Lifang<sup>1</sup>, LIU Jianmin<sup>2</sup>, KONG Qingfei<sup>1△</sup>, MA Haiming<sup>1</sup>, WANG Yanqi<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, LI Xiaolong<sup>3</sup>

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Tuberculosis; 3. Department of Infection Management, the Sixth People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan 450015, China

**Abstract: Objective** To explore the clinical application value of line probe assay in diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. **Methods** From January 2017 to February 2019, 247 smear positive tuberculosis patients in the hospital were selected as the research objects. The drug susceptibility testing and line probe assay were completed within 3 days after the morning sputum samples were collected. The results of drug sensitivity test were used as the "gold standard" for diagnosis. The sensitivity, specificity, accuracy and Yoden index were used to evaluate the diagnostic value of line probe assay. **Results** The detection rates of isoniazid resistance (53 cases, 21.46%), rifampicin resistance (60 cases, 24.29%) and multidrug-resistant tuberculosis (50 cases, 20.24%) by line probe assay were not significantly different from those by traditional drug susceptibility test ( $P > 0.05$ ). The sensitivity (88.89%, 88.52%, 84.62%), specificity (97.41%, 96.77%, 96.92%), accuracy (95.55%, 94.74%, 94.33%) and Yoden index (0.863, 0.853 and 0.815) of the line probe assay for isoniazid resistance, rifampicin resistance, and multidrug-resistant tuberculosis were all higher. **Conclusion** The line probe assay has high sensitivity, specificity and accuracy for the detection of multidrug-resistant tuberculosis, and the detection time is short, which is of great significance for the early diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis.

**Key words:** multidrug-resistant tuberculosis; line probe assay; drug susceptibility test; diagnostic value

结核病是一种慢性感染性疾病, 患者只要按治疗原则进行服药, 绝大多数都能够治愈。若患者没有坚持早期、正规、合理的治疗, 很可能导致耐多药现象的发生, 使疾病的治愈变得十分困难, 增加社会和家庭的负担, 严重者甚至危及其生命。耐多药结核病已成为结核病防治工作面临的重点难题<sup>[1]</sup>, 耐多药结

核病的诊断目前仍采用药敏试验, 虽然诊断结果准确, 但是检测所需时间较长, 难以满足临床早期诊断和治疗的需要。随着分子诊断技术的快速发展, 线性探针技术通过检测多位点基因突变, 可快速确定结核菌株的耐药性<sup>[2-3]</sup>。本研究通过比较药敏试验与线性探针技术对耐多药结核病的诊断结果, 探讨线性探针

\* 基金项目: 河南省科技攻关计划项目(162102310218)。

作者简介: 班立芳, 女, 副主任技师, 主要从事各种传染病的实验室诊断研究。△ 通信作者, E-mail: 761746546@qq.com。

技术的临床应用价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2017 年 1 月至 2019 年 2 月在本院就诊的 247 例涂阳结核病患者为研究对象,均签署知情同意书,其中男 134 例,女 113 例,年龄 19~77 岁,平均(44.29±7.56)岁。该研究通过本院医学伦理委员会审批。

**1.2 仪器与试剂** PCR 核酸扩增仪(美国赛默飞 ABI Veriti)。线性探针测试仪(GT Blot 48 全自动杂交仪)与配套试剂(法国生物梅里埃),结核分枝杆菌及耐药基因检测试剂盒(PCR-线性杂交酶显色法, Geno Type MTBDRplus。批号 IS00173,效期 2018 年 4 月;批号 IS00176,效期 2018 年 7 月;批号 IS00181,效期 2019 年 2 月;批号 IS00186,效期 2019 年 7 月)。分枝杆菌改良罗氏基础(酸性)培养基(河南赛诺特生物。批号 20170118,效期 20170717;批号 20170926,效期 20180325;批号 20180226,效期 20180825;批号 20181119,效期 20190518)。结核分枝杆菌药敏培养基(珠海贝索生物。批号 20170116,效期 20180115;批号 20170613,效期 20180612;批号 20171219,效期 20181218;批号 20180509,效期 2019 00508;批号 2018 1023,效期 20191022)。

**1.3 检测方法** 所有研究对象均采集晨起痰标本,立即放入 4℃ 冰箱(上海澳柯玛 YC-1006 医用冷藏箱)内保存,3 d 内依次完成药敏试验检测和线性探针技术检测。(1)药敏试验检测<sup>[4]</sup>。用无菌吸管吸取 1~2 mL 痰标本转移至前处理管,使用 2 倍的 4% NaOH 溶液对痰标本进行稀释处理,漩涡震荡(江苏新康 XK96-A 震荡器)30~60 s 使标本完全液化,接种至改良罗氏基础(酸性)培养基斜面中,然后放置于 37℃ 恒温箱(北京森信 DRP-9802 电热恒温培养箱)培养 2~3 周。使用接种环在培养基上刮取一环菌落,置入含有 1~2 滴 10% 吐温-80 的磨菌瓶中,研磨后以标准麦氏管(McFar Land)作为参照,使用 BIO-HIT 精确移液器制成 1 g/L 的菌悬液,然后加入无菌生理盐水稀释成 10<sup>-2</sup> g/L 和 10<sup>-4</sup> g/L 的菌悬液,使用 22 号标准接种环分别沾取一滴环(0.01 mL)的菌液,采用划线法分别接种到含异烟肼、利福平的药敏试验培养基及对照培养基中,放置于 37℃ 恒温箱(常州菲普 DNP-250 恒温培养箱)培养 6 周,根据药敏培养基与对照培养基菌落数的比值判断耐药结果。该药敏试验以河南省疾病预防控制中心下发的结核分枝杆菌参考菌株(H37Rv 敏感株)10<sup>-3</sup> mg 作为室内质控。(2)线性探针技术<sup>[5]</sup>。采用超声破碎法(上海仁度 FZP-1 型核酸提取仪)提取痰标本 DNA,取 5 μL DNA 标本加入至 45 μL PCR 扩增体系中,混合后放置于 PCR 核酸扩增仪中进行扩增,具体反应条件如

下:95℃ 15 min;95℃ 30 s,58℃ 2 min,10 个循环;95℃ 25 s,53℃ 40 s,70℃ 40 s,30 个循环;70℃ 10 min。PCR 扩增后,根据 GenoType MTBDRplus 试剂盒说明书,取 20 μL 扩增产物进行变性裂解,再与探针试纸杂交(GT Blot 48 杂交仪),观察试纸条带显色情况,对耐药情况进行判断。判读标准:所有野生型位点显色和所有突变位点不显色为敏感,任一野生型位点不显色或任一突变位点显色为耐药。以药敏试验检测结果作为耐多药结核病诊断的“金标准”。

**1.4 统计学处理** 所有数据采用 SPSS23.0 软件包进行统计学分析。计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验对 2 种检测方法进行比较,检验水准( $\alpha$ )=0.05,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。应用灵敏度、特异度、准确性和约登指数评价 2 种检测方法的诊断价值。

## 2 结果

**2.1 2 种方法对异烟肼耐药性的检测结果** 线性探针技术对异烟肼耐药性的检出率为 21.46%(53/247),药敏试验的检出率为 21.86%(54/247),2 种方法对异烟肼耐药性的检出率比较,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.012, P > 0.05$ ),见表 1。线性探针技术对异烟肼耐药性检测的灵敏度为 88.89%,特异度为 97.41%,准确性为 95.55%,约登指数为 0.863。

**2.2 2 种方法对利福平耐药性的检测结果** 线性探针技术对利福平耐药性的检出率为 24.29%(60/247),药敏试验的检出率为 24.70%(61/247),2 种方法对利福平耐药性的检出率比较,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.011, P > 0.05$ ),见表 1。线性探针技术对利福平耐药性检测的灵敏度为 88.52%,特异度为 96.77%,准确性为 94.74%,约登指数为 0.853。

**2.3 2 种方法对耐多药结核病的检测结果** 线性探针技术对耐多药结核病的检出率为 20.24%(50/247),药敏试验的检出率为 21.05%(52/247),2 种方法对耐多药结核病的检出率比较,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.049, P > 0.05$ ),见表 1。线性探针技术对耐多药结核病检测的灵敏度为 84.62%,特异度为 96.92%,准确性为 94.33%,约登指数为 0.815。

表 1 2 种方法对结核病耐药性的检测结果分析(n)

线性探针技术	异烟肼耐药性			利福平耐药性			耐多药结核病		
	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计
耐药	48	5	53	54	6	60	44	6	50
敏感	6	188	194	7	180	187	8	189	197
合计	54	193	247	61	186	247	52	195	247

## 3 讨论

耐多药结核病是指结核分枝杆菌至少对异烟肼、利福平 2 种抗结核药物产生耐药性,其发生与药物使

用不规范、初始耐药、人口流动性、治疗管理不善等多种因素有关,我国耐多药结核病患者人数逐年增加,已成为该疾病的高负担国家之一<sup>[6]</sup>。耐多药结核病的治疗十分困难,治疗成本较高,因此,快速准确地对结核分枝杆菌耐药性进行检测,以便制订合理、有效的治疗方案,有助于提高疾病的治疗效果,并降低耐药菌传播的风险<sup>[7]</sup>。传统药敏试验是耐多药结核病诊断的“金标准”,但是该方法检测所需时间长,时效性较差,在一定程度上限制了其临床应用。线性探针技术是利用多重 PCR 扩增反应原理,针对异烟肼和利福平耐药常见基因突变位点而设计探针,是一种快速的分子生物学诊断方法,有利于结核病耐药情况的早期筛查和诊断,目前已在很多地区得到推广应用<sup>[8-10]</sup>。

本研究发现,线性探针技术对异烟肼耐药性(21.46%)、利福平耐药性(24.29%)及耐多药结核病(20.24%)的检出率与药敏试验差异无统计学意义( $P>0.05$ ),并且线性探针技术对异烟肼耐药性、利福平耐药性及耐多药结核病检测的灵敏度、特异度、准确性及约登指数也均较高,这与以往研究结果一致<sup>[11-12]</sup>,说明线性探针技术在耐多药结核病的早期诊断方面具有较好的临床应用价值,为疾病的及时、有效治疗提供保障。

综上所述,线性探针技术作为一种辅助诊断技术,对耐多药结核病检测的灵敏度、特异度及准确性均较高,能准确、快速诊断结核分枝杆菌对利福平、异烟肼的耐药性及多药耐药性,与传统的药敏试验检测结果具有高度的一致性,对于耐多药结核病的早期诊断具有重要意义。

## 参考文献

[1] 赵誉洁,闫凯,陈金瓯,等.耐多药肺结核患者生命质量及

(上接第 2115 页)

- [4] 朱为刚,王立林,聂冬梅,等.核酸检测试剂 cobas MPX v2.0 降低输血 HBV 残余风险的评估[J].中国输血杂志,2016,29(6):574-577.
- [5] The Polars Obervatory Collaborates. Global prevalence, teament, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. Lancet Gastroen Hepatol, 2018,3(6):383-403.
- [6] FANG Y, SHANG Q L, LIU J Y, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection amanghepatopathy patients and healthy people in China[J]. J Infent, 2009, 58(5): 383-388.
- [7] 张锋,张琼,林碧,等.血清学联合核酸检测在献血者血液筛查中的互补性[J].中国艾滋病性病,2016,23(3):197-199.

其影响因素分析[J].中国防痨杂志,2019,41(1):88-94.

- [2] 许璐,孙一鑫,詹思延.线性探针技术诊断耐药肺结核准确性的 Meta 分析[J].中华流行病学杂志,2018,39(11): 1491-1495.
- [3] 陈丽,秦玉宝,邹剑,等.线性探针技术检测结核分枝杆菌耐药性的效果分析[J].结核病与肺部健康杂志,2018,7(1):49-53.
- [4] 赵雁林,王黎霞.结核分枝杆菌药物灵敏度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.
- [5] 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.
- [6] 陈华昕,于志明,郑建,等.耐多药肺结核患者预后的影响因素分析[J].医学临床研究,2018,35(11):2192-2194.
- [7] 侯婧,韩菁,张艳,等.线性探针技术检测肺结核患者耐药情况临床评价[J].中国药业,2019,28(2):23-26.
- [8] 钟业腾,林翀,陈灼霖,等.线性探针技术在海南省结核病诊断及耐药性检测中的应用[J].中国热带医学,2019,19(7):662-666.
- [9] 李树涛,杨鹤,关文龙,等.线性探针技术在新疆耐药结核病诊断中的应用评价[J].疾病预防控制通报,2018,33(6):83-85.
- [10] 刘昕亮,曹铸,牟怀德,等.乐山市应用线性探针法快速检测耐药结核病研究[J].预防医学情报杂志,2019,35(9): 1005-1008.
- [11] 张海燕,缪家文,潘洪秋,等.应用线性探针杂交技术快速检测结核分枝杆菌的多药耐药性[J].江苏大学学报(医学版),2017,27(6):539-541.
- [12] 杨健,庄贵华,王西娣,等.线性探针技术在耐多药结核病诊断中的应用评价[J].检验医学与临床,2016,13(10): 1336-1338.

(收稿日期:2019-12-11 修回日期:2020-04-09)

- [8] 马晓军,杨仍勇,李治鹏.乙型肝炎、丙型肝炎单试剂检测阳性献血者的分析[J].检验医学与临床,2019,16(8): 1107-1109.
- [9] LINNEN J M, DERAS M L, CLINE J, et al. Performanceevaluation of the PROCLEIX West Nile virus assayon semi-automated and automated systems[J]. J Med Virol, 2007,79(9):1422-1430.
- [10] 徐志华,张永,周军兵.国产酶免疫双抗原夹心法检测丙型肝炎病毒抗体试剂的应用于分析[J].中国输血杂志, 2017,(11):1285-1287.
- [11] 李云,夏正武,瞿良.乙型肝炎血清学标志物与 HBV DNA 的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(4):442-443.

(收稿日期:2019-12-15 修回日期:2020-04-22)