

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.14.008

二代线性探针技术在结核病诊断及耐药检测中的应用研究

张耀辉¹, 刘 元^{2△}

陕西省西安市胸科医院:1. 医务科;2. 检验科, 陕西西安 710100

摘 要:目的 探讨二代线性探针技术(MTBDR plus V2.0)在结核病及其耐药性诊断中的应用价值。方法 选取 2018 年 6 月至 2019 年 6 月于该院就诊的 1 322 例疑似肺结核患者为研究对象,所有研究对象均用同一份痰标本同时进行痰涂片检测、MGIT 960 液体培养和 MTBDR plus V2.0 基因检测。对培养阳性且鉴定为结核分枝杆菌的菌株进行 MGIT 960 药敏试验。采用 Kappa 检验比较药敏试验结果及效能。结果 以 MGIT 960 液体培养结果为标准,痰涂片和 MTBDR plus V2.0 检测结核分枝杆菌的灵敏度分别为 46.74% 和 87.15%,特异度分别为 98.73% 和 92.74%,Kappa 值分别为 0.45 和 0.80;MGIT 960 液体培养和 MTBDR plus V2.0 对痰涂片阴性肺结核患者检测效能差异无统计学意义($\chi^2=0.071, P=0.790$);MGIT 960 和 MTBDR plus V2.0 对利福平和异烟肼耐药性检测,Kappa 值分别为 0.84 和 0.69。结论 MTBDR plus V2.0 能够快速对结核病进行诊断,且效能与 MGIT 960 液体培养相似,高于痰涂片检测。在利福平耐药检测方面,MTBDR plus V2.0 和 MGIT 960 有较好的一致性,但对异烟肼耐药性检测一致性一般。

关键词:二代线性探针技术; MGIT 960; 结核病; 耐药

中图法分类号:R52

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)14-2015-04

Application of second-generation linear probe technology in tuberculosis diagnosis and drug resistance detection

ZHANG Yaohui¹, LIU Yuan^{2△}

1. Department of Medical Affairs Section; 2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Chest Hospital, Xi'an, Shanxi 710100, China

Abstract: Objective To explore the application value of the second-generation linear probe technology (MTBDR plus V2.0) in the diagnosis of tuberculosis and its drug resistance. **Methods** From June 2018 to June 2019, 1 322 patients with suspected pulmonary tuberculosis in our hospital were selected as the research objects. All the subjects used the same sputum sample for sputum smear detection, MGIT 960 liquid culture and MTBDR plus V2.0 gene detection. The MGIT 960 drug susceptibility test was performed on the strains that were culture-positive and identified as Mycobacterium tuberculosis. Kappa test was used to compare the results and efficacy of drug sensitivity tests. **Results** Using MGIT 960 liquid culture results as the standard, the sensitivity of sputum smear and MTBDR plus V2.0 for detecting Mycobacterium tuberculosis were 46.74% and 87.15%, the specificity were 98.73% and 92.74%, and the Kappa value were 0.45 and 0.80, respectively. MGIT 960 liquid culture and MTBDR plus V2.0 showed no significant difference in the detection efficiency of smear-negative pulmonary tuberculosis patients ($\chi^2=0.071, P=0.790$). MGIT 960 and MTBDR plus V2.0 were tested for resistance to rifampicin and isoniazid, and the Kappa values were 0.84 and 0.69, respectively. **Conclusion** MTBDR plus V2.0 can quickly diagnose tuberculosis, and its efficacy is similar to that of MGIT 960 liquid culture, which is higher than that of sputum smear detection. In terms of rifampicin resistance detection, MTBDR plus V2.0 and MGIT 960 have good consistency, but the consistency of isoniazid resistance detection is general.

Key words: MTBDR plus V2.0; MGIT 960; tuberculosis; drug resistance

结核病是一种严重危害人类健康的疾病,在全球范围内每年新增结核病患者达数百万。同时,结核病也是导致死亡的十大原因之一。2018 年,全球估计有 1 000 万人新感染结核,中国约有 88.9 万人新感染结核,在全球结核病患者中估计有 48.4 万人为新发耐

利福平结核病,中国约占 14%^[1]。因此,找到一种快速检测结核分枝杆菌感染及耐药水平的方法,对结核病防治起着至关重要的作用。二代线性探针技术(MTBDR plus V2.0)是一种快速检测结核分枝杆菌及其耐药基因的方法,在结核病诊断及耐药检测方面

作者简介:张耀辉,男,主治医师,主要从事流行病与卫生统计相关研究。△ 通信作者,E-mail:lyhc413@126.com。

本文引用格式:张耀辉,刘元.二代线性探针技术在结核病诊断及耐药检测中的应用研究[J].检验医学与临床,2021,18(14):2015-2018.

优势巨大。本文通过对比 MTBDR plus V2.0、MGIT 960 液体培养及药敏试验在检测结核分枝杆菌耐药性中的差异,探讨 MTBDR plus V2.0 在临床的应用前景。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6 月至 2019 年 6 月在本院就诊的疑似肺结核患者作为研究对象,肺结核诊断参考《肺结核诊断标准:WS288-2017》^[2]。本研究共纳入研究对象 1 322 例,其中男 898 例、女 424 例,平均年龄(42.05±18.30)岁。纳入标准:(1)年龄 10~80 岁;(2)疑似肺结核(有肺结核临床症状,咳嗽、咳痰≥2 周,持续发热、盗汗、体质量下降等);(3)普通 X 线摄片或 CT 扫描提示肺结核可能;(4)人类免疫缺陷病毒阳性不予排除,可纳入本研究。排除标准:针对目前病情已进行抗结核治疗超过 3 周(不包括既往患结核病有治疗史者)。

1.2 仪器与试剂 BACTEC MGIT 960 液体培养系统购自美国 BD 公司;GT-blot 48 杂交仪购自法国生物梅里埃公司;MGIT 液体培养管及分枝杆菌药物敏感性检测试剂盒购自美国 BD 公司;MPT64 快速抗原检测试剂购自杭州创新生物检控技术有限公司;Geno Type MTBDR plus V2.0 试剂盒购自法国生物梅里埃公司。

1.3 方法

1.3.1 痰涂片 挑取标本中干酪样、脓样或可疑处涂片,于玻片正面右侧 2/3 处均匀涂抹形成 1 cm×2 cm 椭圆形痰膜,于生物安全柜内静置干燥后进行抗酸染色。按照萋尼氏染色镜检分级报告标准报告结果。

1.3.2 MGIT 960 液体培养 把报阳当天算作第 0 天,如果是第 1~2 天直接进行药敏试验接种,第 3~5 天则先用灭菌生理盐水按照 1:4 稀释(1 mL 菌悬液,4 mL 生理盐水)。接种时,取 0.5 mL 结核分枝杆菌阳性菌液接种到含药培养基上(利福平药物浓度 1 μg/mL,异烟肼药物浓度 0.1 μg/mL),对照管内则加入 0.5 mL 的 1:100 倍稀释菌悬液(0.1 mL 菌悬液,10 mL 灭菌生理盐水),盖紧螺旋盖并混匀,放入 MGIT 960 培养系统培养。当生长对照管中生长单位(GU)指数达到 400 时(4~13 d 内),评估含药培养管的 GU 值;含药培养管的 GU 值<100 为敏感,含药培养管的 GU 值≥100 为耐药。

1.3.3 MGIT 960 药敏试验 取结核分枝杆菌阳性产物 0.5 mL 接种到含药培养基上(利福平药物浓度 1 μg/mL,异烟肼药物浓度 0.1 μg/mL)。另取 0.2 mL 阳性产物用磷酸盐缓冲液稀释 100 倍后,取 0.5 mL 接种到生长对照管中,放入 MGIT 960 培养系统培养。当生长对照管中 GU 指数达到 400 时(4~13 d 内),评估含药培养管的 GU 值;含药培养管的 GU 值<100 为敏感,含药培养管的 GU 值≥100 为耐药。

1.3.4 MTBDR plus V2.0 检测 MTBDR plus

V2.0 检测利福平耐药性的原理是通过 8 条分子探针覆盖利福平耐药相关基因 rpoB 核心突变区(RRDR),并能检测其常见突变[D516V(rpoB MUT1)、H526Y(rpoB MUT2A)、H526D(rpoB MUT2B)、S531L(rpoB MUT3)],当检测区域有突变时,可导致相应的野生型条带缺失或突变型条带显色。检测异烟肼耐药性的原理是检测 katG315 位点和 inhA 启动子区基因及其常见突变,2 个基因有 1 个突变即认为异烟肼耐药。

操作步骤:取 0.5 mL 前处理后的痰标本以 10 000×g 离心 15 min,弃上清,加入 100 μL 裂解液(A-LYS),95 ℃水浴 5 min,短暂离心,加入 100 uL 中和缓冲液(A-NB),10 000×g 离心 5 min,上清即为提取的核酸 DNA。取 5 μL 提取后的 DNA 加入含有 35 μL AM-B 和 10 μL AM-A 的扩增体系中,按照说明书的扩增程序进行扩增。扩增完成后取 20 μL 扩增产物进行杂交,杂交过程包括化学变性、杂交孵育、洗涤、偶联和显色等。根据显色结果进行耐药情况的判读。判读标准:野生条带均显色且突变条带无显色时为敏感,野生条带有缺失或突变条带显色为耐药。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行处理和分析。药敏试验结果比较及检测方法效能比较采用 Kappa 检验。Kappa 值>0.75 为一致性好;Kappa 值<0.45 为一致性差。计数资料以例数和百分率表示,对检测方法阳性率的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTBDR plus V2.0 和痰涂片方法检测结核分枝杆菌效能 以 MGIT 960 液体培养结果为标准,痰涂片检测方法的灵敏度为 46.74%,特异度为 98.73%,阳性预测值为 96.17%,阴性预测值为 73.04%,Kappa 值为 0.45。MTBDR plus V2.0 检测方法的灵敏度为 87.15%,特异度为 92.74%,阳性预测值为 89.14%,阴性预测值为 91.34%,Kappa 值为 0.80。见表 1。

表 1 各种方法对痰标本中结核分枝杆菌检测效能比较(n)

检测方法	MGIT 960 液体培养	
	阳性	阴性
痰涂片		
阳性	251	10
阴性	286	775
MTBDR plus V2.0		
阳性	468	57
阴性	69	728

2.2 涂片阴性肺结核患者中 MTBDR plus V2.0 与 MGIT 960 液体培养检测效能比较 1 322 例研究对象中,痰涂片阴性者 1 061 例,其中痰涂片阴性肺结核

患者 838 例,经 MTBDR plus V2.0 检测结核分枝杆菌阳性 250 例,阳性检出率为 29.83%(250/838);MGIT 960 液体培养检测阳性 255 例,阳性检出率为 30.43%(255/838)。MTBDR plus V2.0 和 MGIT 960 液体培养对痰涂片阴性肺结核患者的阳性检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.071,P=0.790$)。

2.3 MTBDR plus V2.0 对利福平和异烟肼耐药性的检测效能 对 437 例同时进行 MGIT 960 药敏试验和 MTBDR plus V2.0 耐药基因检测,以 MGIT 960 药敏试验检测结果为标准,MTBDR plus V2.0 检测利福平耐药性的灵敏度、特异度和 Kappa 值分别为 88.75%、95.52%和 0.84,Kappa 检验结果显示,MTBDR plus V2.0 检测利福平耐药性与 MGIT960 药敏试验具有较好的一致性。MTBDR plus V2.0 检测异烟肼耐药性的灵敏度、特异度和 Kappa 值分别为 71.43%、97.37%和 0.69,Kappa 检验结果显示,MTBDR plus V2.0 检测异烟肼耐药性与 MGIT 960 药敏试验一致性一般。见表 2。

表 2 MTBDR plus V2.0 对 MTB 利福平和异烟肼 耐药性检测效能					
MTBDR plus V2.0	MGIT 960 液体培养(<i>n</i>)		灵敏度 (%)	特异度 (%)	Kappa 值
	耐药	敏感			
利福平					
耐药	71	16	88.75	95.52	0.84
敏感	9	341			
异烟肼					
耐药	95	8	71.43	97.37	0.69
敏感	38	296			

3 讨 论

耐药和耐多药结核病增多是我国结核病疫情控制不佳的主要原因。耐药和耐多药结核病不但病死率高,对健康人群也威胁极大。目前诊断结核病及检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性的“金标准”仍然是结核菌培养和表型药敏检测方法,然而培养和得到药敏结果往往需要 1~2 个月时间,已不能满足现阶段临床需要。GeneXpert 是一种能够在 2 h 内从患者临床标本中检测出结核分枝杆菌及利福平耐药性的分子检测方法^[3],但 GeneXpert 只能检测利福平耐药性,无法对异烟肼耐药性进行检测,而现阶段异烟肼的耐药形势同样不容忽视,据研究报道,初治结核异烟肼耐药率为%,复治患者约为 7.9%^[4-5],目前迫切需要一种能快速从疑似肺结核患者临床标本中检测出利福平和异烟肼耐药性的方法。

MTBDR plus V2.0 是一种能够快速从肺结核患者标本中检测出结核分枝杆菌及利福平、异烟肼耐药性的分子检测方法。MTBDR plus V2.0 在其第一代技术基础上,优化了 DNA 提取方法及 PCR 扩增体

系^[6],与第一代技术相比提高了检测的灵敏度,MTBDR plus V2.0 最大的优点是能对痰涂片阴性肺结核患者标本进行直接检测。在 6 h 内检测出标本中的结核分枝杆菌及其对利福平和异烟肼的耐药性^[7],弥补了表型药敏方法和 GeneXpert 这 2 种方法的不足。

本研究中,以 MGIT 960 液体培养为标准,MTBDR plus V2.0 检测痰标本中结核分枝杆菌的灵敏度为 87.15%,特异度为 92.74%,Kappa 值为 0.80,与 MGIT 960 液体培养检验结果具有较好一致性,这与相关研究报道一致^[8-9],表明在诊断结核病方面,MTBDR plus V2.0 具有较好的诊断能力;同时,与痰涂片进行比较,其诊断灵敏度明显高于痰涂片的 46.74%。另外,本研究注意到 MGIT 960 液体培养阳性的 537 例标本中经鉴定有 12 例为非结核分枝杆菌,这 12 例标本经 MTBDR plus V2.0 检测均为阴性,表明在临床标本的检测中 MTBDR plus V2.0 可以避免非结核分枝杆菌对结果的影响,这与说明书上特异度分析结果相符合。

对痰涂片阴性肺结核患者进行检测,MGIT 960 液体培养检出率为 30.43%(255/838),MTBDR plus V2.0 阳性检出率为 29.83%(250/838),这 2 种方法对痰涂片阴性肺结核患者检测灵敏度无差异,略微高于李强等^[10]的报道,由此可以认为,MTBDR plus V2.0 对于痰涂片阴性肺结核患者具有较好的应用前景。

以 MGIT 960 药敏试验结果为参考标准,MTBDR plus V2.0 检测痰标本利福平耐药性的灵敏度为 88.75%,特异度为 95.52%,Kappa 值为 0.84。检测异烟肼耐药性的灵敏度为 71.43%,特异度为 97.37%,Kappa 值为 0.69。这与相关研究检测结果基本一致^[8-9]。MTBDR plus V2.0 与 MGIT 960 药敏试验检测利福平耐药性有 25 例不同,其中 16 例为 MTBDR plus V2.0 检测耐药而 MGIT 960 药敏试验检测敏感,分析原因可能为:rpoB 基因耐药突变区发生了沉默突变或这些突变株发生了低水平的耐药,MGIT 960 药敏试验对这种低水平的耐药检测不出^[11-13]。另有 9 例 MTBDR plus V2.0 检测敏感而 MGIT 960 药敏试验检测耐药,原因可能是存在 rpoB 核心突变区以外的其他耐药突变位点;或者存在其他利福平的耐药机制,比如 MTB 外排泵基因的过表达^[14]。

MTBDR plus V2.0 与 MGIT 960 药敏试验检测异烟肼耐药性共有 46 例不同,其中 38 例为 MTBDR plus V2.0 检测敏感而 MGIT 960 药敏试验检测耐药,对这 38 例菌株进行了测序(katG 基因和 inhA 基因),发现有 37 例未发生 katG 基因和 inhA 基因突变,与 MTBDR plus V2.0 检测一致,分析这一部分表型检测耐药的原因可能为发生了 katG 和 inhA 基因以外的突变,比如 kasA、ahpC、ndh 等其他基因突变,研究报道这一比例约占异烟肼耐药的 20%^[15]。有 1

例经测序发生了 katG315 位点的突变,与 MTBDR plus V2.0 检测不一致,这一例可能是由于操作误差导致的。另外 8 例为 MTBDR plus V2.0 检测耐药而 MGIT 960 药敏试验检测敏感,经测序发现这 8 例有 3 例发生了 katG315 位点的突变,5 例发生了 inhA 基因突变,与 MTBDR plus V2.0 检测结果完全一致,分析其可能原因是发生了低水平耐药,MGIT 960 药敏试验未检测出来,这种现象在相关研究中均有报道^[8,16]。

综上所述,MTBDR plus V2.0 能够快速检测 MTB,特异度高,具有与 MGIT 960 相似的灵敏度,对痰涂片阴性肺结核诊断具有较好的诊断能力。同时,可以准确检测利福平和异烟肼耐药性,在结核病诊治及防控中具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2019 [R]. Geneva:WHO,2019.

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准:WS288-2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017:11.

[3] 牛海军,王歌,李明虎. GeneXpert MTB/RIF 检测在肺结核诊断中的价值评估[J]. 中国防痨杂志,2017,39(8):829-832.

[4] 李桂莲,万康林. 结核分枝杆菌异烟肼耐药性:一个不容忽视的问题[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(6):475-479.

[5] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 [R]. Geneva:WHO,2018.

[6] 刘元,周俊,崔晓利. MTBDR plus 2.0 技术对疑似肺结核和耐多药结核病患者的诊断价值[J]. 中国防痨杂志,2019,41(12):1277-1282.

[7] LI Q,DONG H Y,PANG Y,et al. Multicenter evaluation of the molecular line probe assay for multidrug resistant mycobacterium tuberculosis detection in China [J]. Biomed Environ Sci,2015,28(6):464-467.

[8] TAN Y J,LI Q,WANG Q,et al. Evaluation of the MTB-

DRplus 2.0 assay for the detection of multidrug resistance among persons with presumptive pulmonary TB in China[J]. Sci Rep,2017,7(1):3364.

[9] MEAZA A,KEBEDE A,YAREGAL Z,et al. Evaluation of genotype MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples[J]. BMC Infect Dis,2017,17(1):280.

[10] 李强,包训迪,刘元,等. MTBDRplus V2.0 用于诊断涂阴疑似肺结核患者的效果评价[J]. 中国防痨杂志,2016,38(7):544-548.

[11] WILLIAMSON D A,BASU I,BOWER J,et al. An evaluation of the Xpert MTB/RIF assay and detection of false-positive rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2011,74(2):207-209.

[12] RIGOUTS L,GUMUSBOGA M,DE-RIJK W B,et al. Rifampin resistance missed in automated liquid culture system for Mycobacterium tuberculosis isolates with specific rpoB mutations[J]. J Clin Microbiol,2013,51(8):2641-2645.

[13] VAN-DEUN A,AUNG K J,BOLA V,et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard[J]. J Clin Microbiol,2013,51(8):2633-2640.

[14] LI G,ZHANG J,GUO Q,et al. Study of efflux pump gene expression in rifampicin-mono-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates[J]. J Antibiot (Tokyo),2015,68(7):431-435.

[15] DOUSTDAR F,KHOSRAVI A D,FARNIA P,et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of Mycobacterium tuberculosis isolates from Iran[J]. Microb Drug Resist,2008,14(4):273-279.

[16] 潘洁茹,叶海梅,吴祖达,等. MTBDR plus 技术快速检测结核分枝杆菌耐多药的临床应用评价[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(6):509-513.

(收稿日期:2020-11-26 修回日期:2021-04-18)

(上接第 2014 页)

[5] 金宇亭,张宇,胡维. 等血清中性粒细胞载脂蛋白检测对急性细菌感染性疾病的诊断价值[J]. 山东医药,2016,56(9):90-92.

[6] 卢象对,王丽,彭建明. 中山地区病毒性腹泻患儿病原体感染情况及流行病学特点分析[J]. 检验医学与临床,2019,16(12):1662-1664.

[7] 周玉爱. 血浆 sTREM-1、CD64 联合检测对细菌性腹泻患儿的早期诊断价值分析[J]. 医学检验与临床,2020,31(3):17-21.

[8] 陈少霖,张卫星,张声,等. 可溶性髓样细胞触发受体-1 在呼吸机相关性肺炎的早期诊断及预后评估中的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(13):2968-2971.

[9] 农贤刚,程卫萍. 中性粒细胞 CD64 和血清 sTREM-1 在

老年社区获得性肺炎中的诊断价值探讨[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(6):871-874.

[10] 杨红玲,郑磊,周才,等. 胶体金渗滤法检测血清淀粉样蛋白 A 方法评价及其在儿童感染性疾病诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(11):836-841.

[11] 叶映红,李雪华,邱双成. SAA、hs-CRP 和 WBC 联合检测在儿童感染性疾病的应用[J]. 医学检验与临床,2020,31(3):22-24.

[12] 费凤英,衣萍,林见敏. 血清淀粉样蛋白 A 与 C 反应蛋白联合检测的临床应用价值[J]. 检验医学,2014,29(10):1031-1033.

(收稿日期:2020-12-06 修回日期:2021-04-08)