

Geno-type MTBDRplus 分子线性探针杂交技术在结核病诊断与耐药性检测中的应用价值

李 津^a, 李昌锦^b, 杨 洁^b, 黄 婷^b, 樊金燕^a

(联勤保障部队第900医院 a. 结核科; b. 检验科, 福州 350003)

摘要:目的 评价 Geno-type MTBDRplus 分子线性探针杂交技术显色法(以下简称杂交酶显色法)在结核病快速诊断及检测异烟肼(INH)和利福平(RIF)药物敏感中的应用。方法 选取2016年1月~2019年12月的临床确诊结核患者的临床标本413例,同时采用BD 960液体培养法和杂交酶显色法进行结核分枝杆菌检测,并对其中108株菌株进行异烟肼和利福平药敏检测,比较两种方法的一致性。结果 杂交酶显色法测得结核分枝杆菌358例(86.68%),BD 960液体培养法测得结核分枝杆菌376例(91.04%);两种方法结果相符349例(84.50%)。108株菌株中杂交酶显色法和BD 960液体培养法分别检出异烟肼敏感87株(80.56%)和88株(81.48%),检出利福平敏感96株(88.89%)和94株(87.04%)。两种方法对结核分枝杆菌的鉴定及异烟肼、利福平药物敏感检测具有高度一致性。结论 与BD 960液体培养法相比,杂交酶显色法检测结核分枝杆菌及异烟肼和利福平药敏更为快速有效。

关键词: 线性杂交酶显色法; 结核分枝杆菌; 药物敏感性

中图分类号: R52; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414(2021)04-119-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.025

Value of Geno-type MTBDRplus Molecular Linear Probe Hybridization in Tuberculosis Diagnosis and Drug Resistance Detection

LI-jin^a, LI Chang-jin^b, YANG Jie^b, HUANG Ting^b, FAN Jin-yan^a

(a. Department of Tuberculosis; b. Department of Clinical Laboratory, the 900 Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Objective To evaluate the utility of the Geno-type MTBDRplus molecular linear probe hybridization coloration assay (hereafter referred to as line probe assay) for rapid screening of tuberculosis and drug sensitivity to isoniazid (INH) and rifampicin (RIF). **Methods** 413 cases of clinically diagnosed tuberculosis from January 2016 to December 2019 were included. The BD 960 liquid culture method and the line probe assay were used to detect *Mycobacterium tuberculosis*. Among them, 108 strains were also tested for INH and RIF drug sensitivity. The consistency of the two methods was compared. **Results** 358 cases of *Mycobacterium tuberculosis* were detected by line probe assay and 376 cases by BD 960 liquid culture method. 349 cases (84.5%) were identified by the two methods. Among 108 strains, 89 strains were sensitive to INH, 98 strains were sensitive to RIF, and 77 strains were sensitive to INH and RIF. In BD 960 liquid culture, 85 strains were INH sensitive, 93 strains were RIF sensitive, 81 strains were INH and RIF sensitive. The coincidence rate of INH and RIF was 67.59% and 85.19% respectively. The results of identification of *Mycobacterium tuberculosis* and analysis of INH and RIF drug sensitivity showed that the two methods were consistent. **Conclusion** Compared with the BD 960 liquid culture method, the line probe assay provides a more rapid and effective method for the clinical diagnosis of tuberculosis and INH and RIF drug-resistance, which may provide a basis for the development of targeted treatment for patients.

Keyword: linear hybridization enzyme coloration assay; *Mycobacterium tuberculosis*; drug sensitivity

结核菌耐药是结核病治疗过程中面临的主要问题,其疗程长、药物副反应多且严重、患者预后差,已受到越来越多的关注。据统计我国每年新发结核病例中,5.7%为多重耐药结核患者,其中又有8%为泛耐药结核分枝杆菌感染^[1]。因而结核菌耐药性

检测极为重要。目前临床上多采用BD 960液体培养法进行结核分枝杆菌的鉴定及耐药性的检测,该方法敏感度低、耗时较长,往往导致诊断及针对性治疗的延误。随着结核菌耐药机制的不断进展,Geno-type MTBDRplus 分子线性探针杂交技术逐步

作者简介: 李 津 (1967-),男,医学硕士,结核科副主任医师,研究结核病防治, E-mail: lijin900@126.com。

通讯作者: 樊金燕 (1980-),女,本科,结核科主管护师,研究方向为结核病治疗及预防, E-mail: 690942071@qq.com。

得到重视。这种方法应用生物素标记的引物进行靶序列的扩增,并与固定的寡核苷酸探针杂交,最后通过酶联免疫法显示结果^[2]。该技术不仅可对结核分枝杆菌复合群保守序列进行鉴定,还可根据相关基因突变对异烟肼和利福平的耐药表型进行检测。本研究应用线性探针法对结核菌样本进行检测,并与BD 960液体培养法的检测结果及其药敏结果进行比较,对两种方法的检测效果进行评价,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2016年1月~2019年12月在本院门诊及住院的临床确诊结核患者的送检标本413例,其中男性315例(76.27%),女性98例(23.73%)。年龄8~89岁。

1.2 仪器与试剂 BACTEC MGIT 960及相关试剂(美国BD公司);GT-Blot 48及相关试剂(德国Hain Lifescience公司);结核分枝杆菌抗原试剂盒(杭州创新生物公司);抗酸染色液(珠海贝索公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 BD 960液体培养法检测结核分枝杆菌及异烟肼、利福平耐药性:严格按仪器使用说明书操作,培养阳性标本经抗酸染色镜检并用结核分枝杆菌抗原检测试剂盒鉴定为结核分枝杆菌。

1.3.2 线性探针杂交法检测结核分枝杆菌及异烟肼、利福平耐药性:严格按仪器使用说明书操作,将PCR扩增、反向杂交、膜显色技术合为一体,通过引物扩增目的片段,扩增产物与膜上固定的特异性探针杂交,杂交物通过酶显色反应判断结果。

1.4 统计学分析 应用SPSS 17.0软件进行统计分析,两种检验方式一致性分析采用Kappa值检验。Kappa值0.0~0.20代表极低的一致性,0.21~0.40代表一般的一致性,0.41~0.60代表中等的一致性,0.61~0.80代表高度的一致性,0.81~1代表几乎完全一致。

2 结果

2.1 两种方法对结核分枝杆菌检出率的比较 413例临床确诊病例的样本,经BD960液体培养法检测呈阳性为376例(91.04%),经抗酸染色镜检及凯必利鉴定均为结核分枝杆菌。上述样本经杂交酶显色法检测呈阳性为358例(86.68%)。两种检测方法的结果相符349例,符合率为84.5%(349/413),检测结果高度一致。

2.2 两种方法对异烟肼、利福平药敏检测结果的比较 用BD960液体培养法和杂交酶显色法对108株结核分枝杆菌进行异烟肼、利福平药敏检测。两种检测方法均测定异烟肼敏感有83例,符合率为76.85%(83/108),Kappa值=0.731,两者具有高度

一致性;两种检测方法均测定利福平敏感者有94例,符合率为87.04%(94/108),Kappa值=0.793,两者结果亦高度一致。

3 讨论

据2020年10月14日,世界卫生组织(WHO)发布了《2020年全球结核病报告》中估算,全球结核病潜伏感染人群接近20亿,2019年全球新发结核病患者约996万,发病率为130/10万,新发的结核病患者中约有3.3%的新患者和18%的复治患者对利福平耐药。估算利福平耐药结核病患者约46.5万,其中耐多药结核病约占78%。因此,结核菌耐药株是我国结核病防治所面临的主要挑战,其治疗疗程长、药物副反应多且难以耐受、患者预后差,寻找一种快速检测且同时检测利福平耐药的技术已受到越来越多的关注。近年来,线性探针法已被WHO推荐用于结核分枝杆菌耐药株的快速检测^[3]。

本研究显示,BD960液体培养法和杂交酶显色法检测结核分枝杆菌的结果高度一致。由于本研究是回顾性观察分析,部分患者未做药敏及耐药检测,所以药敏检测菌株例数较少。在药敏检测结果上与之之前相关报道略有不同^[4-5],其原因有待于今后进一步分析。但有研究认为,在细菌量级别为“极低”时,存在无法确定是否对利福平耐药及对利福平耐药检测结果的假阳性例数明显偏高^[6]。

由于异烟肼和利福平是治疗结核病的一线药物,其产生耐药是治疗失败的主要原因之一,而传统药敏实验采用罗氏固体培养基或BD 960液体培养法检测结核分枝杆菌的耐药耗时长(42天),严重影响临床对患者的及时诊治。与之相比,杂交酶显色法具有操作快速、且直接检测临床标本的优点,不必等待结核菌的培养结果,从而显著缩短了检测周期。另外,杂交酶显色法与GeneXpert等快速分子诊断技术不同,它不仅检测利福平的耐药情况,而且同时进行异烟肼的耐药性检测,对于临床快速诊断、并检测药物的耐药情况,进行准确评估、制定、实施有针对性的个体治疗提供重要诊断依据。近来研究表明,PCR线性杂交酶显色法与传统培养法具有较高的一致性,并可明显缩短肺外结核的病原菌耐药性分析的等待时间^[7-8]。另外,有研究者指出,初治患者使用分子生物学快速检测技术做出利福平耐药或耐多药结核病的诊断特别要注意进行二次确认,以减少错误的诊断和治疗^[9]。本研究因经费原因,所有菌株并未进行测序及耐药突变基因的检测进行确认。

研究表明,PCR线性杂交酶显色法是一种经济、快捷的结核病实验诊断技术^[10],它与其他检验方法联合应用可进一步提高结核病的诊断效率^[11-12]。

辅以其他促进排痰的方法,检测阳性率将进一步提高^[13]。本研究发现,PCR线性杂交酶显色法是一种快速、可靠的检测方法,能在24 h内判断出是否存在结核分枝杆菌感染。因此,我们推测,在经过BD 960液体培养法培养后,可以不需要42天的培养,在培养周期中优化选择出一个比较好的时间节点培养出数量级别的杆菌后,再使用PCR线性杂交酶显色法,可以清楚直观地显示INH和RIF的耐药情况,增加结果的准确性。

参考文献:

- [1] ZHAO Yanlin, XU Shaofa, WANG Lixia, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. The New England Journal of Medicine, 2012, 366(23): 2161-2170.
- [2] ALBERT H, BWANGA F, MUKKADA S, et al. Rapid screening of MDR-TB using molecular Line Probe Assay is feasible in Uganda[J]. BMC infectious diseases, 2010, 10(1):41.
- [3] World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): policy statement [EB]. Geneva: World Health Organization, 2008. http://www.who.int/tb/features_archive/policy_statement.pdf.
- [4] 许蕴怡, 蔡杏珊, 刘燕文, 等. PCR线性杂交酶显色法与BD960液体法在耐多药结核杆菌药敏结果的对比分析[J]. 现代医院, 2016, 16(4): 529-531. XU Yunyi, CAI Xingshan, LIU Yanwen, et al. The results of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility between linear hybrid enzyme coloration method and BD960 susceptibility method[J]. Modern Hospital, 2016, 16(4):529-531.
- [5] 崔俊伟, 蔡瑞艳, 王永亮. 分子线性探针杂交法在结核分枝杆菌耐药性快速检测中的应用价值[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(10):920-923. CUI Junwei, CAI Ruiyan, WANG Yongliang. Application value of molecular linear probe hybridization in rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2017, 34(10):920-923.
- [6] 刘元, 周俊, 崔晓利, 等. GeneXpert MTB/RIF检测结核分枝杆菌对利福平耐药假阳性与标本低水平菌量的关系[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(2):176-180. LIU Yuan, ZHOU Jun, CUI Xiaoli, et al. The relationship between false-positive rifampicin resistant results of GeneXpert MTB/RIF and very low bacterial load in the clinical samples[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2019, 41(2):176-180.
- [7] KUMARI R, TRIPATHI R, PANDEY A P, et al. Rapid screening of MDR-TB in cases of extra pulmonary tuberculosis using Geno type MTBDRplus[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159651.
- [8] GHANEKAR C, PATEL D, ABHYANKAR M, et al. Role of line probe assay in detection of extra-pulmonary tuberculosis: Experience from a tertiary care hospital in western Maharashtra[J]. The Indian Journal of Tuberculosis, 2019, 66(3): 325-330.
- [9] 李仁忠, 王黎霞. 实验室新技术用于耐药结核病诊断流程的建议[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(7): 568-569. LI Renzhong, WANG Lixia. Suggestion of new laboratory technology for drug resistant tuberculosis diagnosis process[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2016, 39(7):568-569.
- [10] SOARES V M, ALMEIDA I N D, VATER M C, et al. Genotype[®]MTBDRplus and xpert[®]MTB/RIF in the diagnosis of tuberculosis and resistant tuberculosis: cost analysis in a tertiary referral hospital[J]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2020, 53(34): e20190175.
- [11] 张培莉, 刘义庆, 邵婧, 等. 结核感染T淋巴细胞IFN- γ 释放实验临床检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1):22-25, 29. ZHANG Peili, LIU Yiqing, SHAO Jing, et al. Interferon gamma release assays from T lymphocytes in patients with tuberculosis infection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 22, 25, 29.
- [12] LÜ Chunfang, WU Jianhong, PIERRE-AUDIGIER C, et al. Combination of xpert MTB/RIF and MTBDRplus for diagnosing tuberculosis in a Chinese district[J]. Medical Science Monitor, 2020, 26:e923508.
- [13] 廖东宁, 熊志刚, 刘庆华. 口服氨溴索提高肺结核痰涂片阳性检出率的应用观察[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4):145-147. LIAO Dongning, XIONG Zhigang, LIU Qinghua. Observation and application of oral ambroxol in improving positive rate of tuberculosis laboratory test by sputum smear[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(4): 145-147.

收稿日期: 2021-01-04 修回日期: 2021-04-15

(上接第9页)

- [14] 吴园园, 管世鹤, 杨凯, 等. 血清肿瘤标志物在肺癌辅助诊断中的应用[J]. 中国微生态学杂志, 2017, 29(5): 547-549. WU Yuanyuan, GUAN Shihe, YANG Kai, et al. The value of serum tumor markers in the diagnosis of lung cancer[J]. Chinese Journal of Microecology, 2017, 29(5):547-549.
- [15] DONG Aoran, ZHANG Jiali, CHEN Xiaobin, et al. Diagnostic value of ProGRP for small cell lung cancer in different stages[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(4): 1182-1189.
- [16] 孙红梅, 陈文彰, 燕丽香, 等. 4种肿瘤标志物在肺癌病理分型、分期中的临床价值[J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(9): 2105-2109. SUN Hongmei, CHEN Wenzhang, YAN Lixiang, et al. Clinical value of four serum tumor markers in pathology type and stage of lung cancer[J]. Journal of Modern Oncology, 2014, 22(9):2105-2109.
- [17] 武彩虹, 钱成荣, 韩玉成, 等. CEA, SCC-Ag, NSE及SE-CAD在肺癌病理分型、分期中的临床价值[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(2):240-243. WU Caihong, QIAN Chengrong, HAN Yucheng, et al. Clinical value of CEA, SCC-AG, NSE and SE-CAD in pathology type and stage of lung cancer[J]. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 2016, 20(2):240-243.

收稿日期: 2020-12-30 修回日期: 2021-05-08