

线性探针技术在耐药结核病诊断中的应用

徐东芳,王超,包训迪,王庆

作者单位:安徽省胸科医院检验科,安徽 合肥 230022

通信作者:王庆,男,副主任技师,研究方向为临床检验诊断学,E-mail:ahtbwangqing@163.com

基金项目:安徽省卫生计生委科研项目(15tb011)

摘要:目的 应用线性探针技术(LiPA)检测结核病的耐药情况。方法 连续纳入安徽省胸科医院2018年9—12月结核病疑似病人479例,同时用LiPA和传统BACTEC™ MGIT 960快速液体法(以下简称为“MGIT 960法”)进行结核分枝杆菌复合群(MTBC)检测和利福平、异烟肼药敏试验,评价其检测效能。结果 以MGIT 960法为标准,LiPA检出MTBC的灵敏度、特异度分别为96.82%和97.45%,两者差异无统计学意义($\chi^2=0.64, P=0.424$);检测利福平耐药的灵敏度、特异度为95.18%和96.34%,检测异烟肼耐药的灵敏度、特异度为81.61%和95.72%,两者均差异无统计学意义(利福平: $\chi^2=0.36, P=0.549$;异烟肼: $\chi^2=2.04, P=0.152$)。此外,LiPA检测利福平耐药株突变率最高的是S531L位点,占62.791% (54/86),异烟肼耐药株突变率最高的是单独KatG基因突变,占84.810% (67/79)。结论 以MGIT 960法为标准,线性探针技术诊断耐药结核病具有灵敏度高、特异性强、快速准确的特点,能为耐药结核病的早期发现和治疗提供诊断依据。

关键词:结核;抗多种药物性; DNA探针; 肺结核; 利福平; 异烟肼; 药敏试验

Application of line probe technology in the diagnosis of drug-resistant tuberculosis

XU Dongfang, WANG Chao, BAO Xundi, WANG Qing

Author Affiliation: Department of Clinical Laboratory, Anhui Chest Hospital, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: Objective To evaluate the performance of Line probe assay (LiPA) for rapid screening drug resistance of tuberculosis. **Methods** A total of 479 suspected tuberculosis patients were enrolled consecutively in the Anhui Chest Hospital from September to December 2018. Meanwhile, the detection of Mycobacterium tuberculosis (MTBC) and the drug sensitivity tests of rifampicin and isoniazid were carried out by LiPA and BACTEC™ MGIT 960 (MGIT 960) liquid culture, respectively. The detection efficiency was evaluated. **Results** Compared with MGIT 960, the sensitivity, specificity of LiPA for MTBC detection were 96.82% and 97.45%. There is no statistically significant differences between them ($\chi^2=0.64, P=0.424$). The sensitivity and specificity of the detection of rifampicin resistance were 95.18% and 96.34%, respectively; and the sensitivity and specificity of the detection of isoniazid resistance were 81.61% and 95.72%, without statistically significant differences (RFP: $\chi^2=0.36, P=0.549$; INH: $\chi^2=2.04, P=0.152$). Additionally, the highest mutation rate of rifampicin resistant strains detected by LiPA was S531L site, accounting for 62.791% (54/86), and the highest mutation rate of isoniazid resistant strains was katG single gene mutation, accounting for 84.810% (67/79). **Conclusion** Compared with MGIT 960, LiPA has characteristics of high sensitivity, specificity and rapid accuracy for rapid screening and detection of drug-resistant tuberculosis, which can provide diagnostic basis for the early detection and treatment of drug-resistant tuberculosis.

Key words: Tuberculosis, multidrug-resistant; DNA probes; Tuberculosis; Rifampin; Isonozid; Drug susceptibility testing

肺结核是一种严重威胁人类健康的疾病,是由结核分枝杆菌感染病人的肺部而引起的一种感染性疾病^[1]。我国2007—2008年结核病耐药基线调查结果显示,肺结核病人耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)率为8.32%,广泛耐多药(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-

TB)率为0.68%,估计全国每年大约新发MDR-TB病人14万例^[2]。我国结核病实验室诊断能力普遍低,临床上传统的结核分枝杆菌培养和药敏试验——BACTEC™ MGIT 960快速液体法(以下简称为“MGIT 960法”)生物安全要求高,所耗时间长,限制其在临床中的应用。近年来,随着结核病耐药分子

机制研究逐步取得新进展,人们建立了多种检测耐药结核病耐药基因的快速分子诊断技术。线性探针技术(line probe assay, LiPA)通过检测结核分枝杆菌利福平耐药基因 *ropB* 以及异烟肼耐药基因 *katG* 和 *inhA* 常见突变,可于 6~8 h 内完成耐药结核病检测^[3]。本研究旨在以 MGIT 960 法为标准,用 LiPA 检测 479 例临床疑似结核病病人痰标本中结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)及相关耐药基因 *rpoB*、*katG* 及 *inhA* 的突变,评价 LiPA 检测效能及推测 MTBC 对利福平和异烟肼的耐药性,为耐药结核病的早期诊断提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 据《肺结核诊断和治疗指南》^[4],连续纳入 2018 年 9 月至 12 月安徽省胸科医院结核科收治的 479 例结核病疑似病人的痰标本。其中,男 361 例,女 118 例;年龄(48.07±12.52)岁,范围为 12~85 岁。病人或其近亲属签署知情同意书,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器和试剂 BACTEC™ MGIT 960 全自动快速分枝杆菌培养鉴定系统;分枝杆菌生长指示管(*mycobacterial growth indicator tube*, MGIT);分枝杆菌培养添加剂(主要包括:油酸、白蛋白、葡萄糖和过氧化氢酶);分枝杆菌药敏试剂盒系列(异烟肼、利福平一线抗结核药物)均为美国 BD 公司产品;MPT 64 抗原(杭州创新生物技术有限公司);GenoType MTBDRplus 试剂盒(德国 Hain Lifescience 公司产品)。

1.2.2 方法 留取 1~3 mL 痰,4% 氢氧化钠消化前处理后,加入 1 mL 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH6.8)混匀沉淀物,0.5 mL 接种 BD MGIT 960 管(含 0.8 mL 营养添加剂),0.5 mL 用于 LiPA 检测,对所有入选痰标本同时进行 MGIT 960 培养和 LiPA 检测。

1.2.2.1 MGIT 960 法菌型鉴定和液体药敏试验 阳性培养物均做初步菌型鉴定,滴加 3~4 滴(约 120 μL)于 MTBC 分泌蛋白 64(*Mycobacterium tuberculosis* secreting protein, MPT64)反应板上进行快速鉴定,鉴定为 MTBC 的菌株,严格按照《结核病实验室诊断技术培训教程》^[5]和 BD MGIT 960 说明书操作手册将其加入含有利福平(1 mg/L)和异烟肼(0.1 mg/L)药物的培养管中,进行利福平和异烟肼的耐药性检测。

1.2.2.2 LiPA 检测方法 留取的 0.5 mL 临床痰标本前处理液于 12 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加

入 100 μL 无菌高纯水中,充分混悬沉淀,95 ℃水浴 20 min,超声 15 min 后,5 μL DNA 提取液用于 PCR 过程,扩增 30 个循环,取 20 μL 扩增产物经过化学变性、杂交孵育、洗涤、耦联和显色后,根据试纸条上的探针显色结果判定样本中是否含有 MTBC 及其对利福平和异烟肼的耐药性。

1.2.3 质量控制 每次 LiPA 检测均有阳性对照 H₃₇Rv 和阴性对照(水)进行质控。LiPA 检测在双盲下操作,野生条带缺失且突变条带未出现突变、野生或质控条带极弱甚至缺失,影响结果判读的阳性培养物重新进行检测。

1.3 统计学方法 本研究均为计数资料,使用 SPSS 22.0 软件,采用配对 χ^2 检验(McNemar 检验)和 Kappa 一致性检验以验证检测结果的统计学差异与一致性。当 Kappa ≥ 0.75 时,一致性较好;0.40 ≤ Kappa < 0.75 时,一致性一般;Kappa < 0.40 时,一致性较差。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTBC 检测效能的比较分析 以 MGIT 960 法为标准, LiPA 检出 MTBC 的灵敏度和特异度分别为 96.82% (274/ 283), 97.45% (191/196), 两者检测的阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。且经 Kappa 一致性检验, Kappa = 0.940, $P < 0.001$, 一致性较好。

表 1 LiPA 检测 479 例结核病疑似病人的痰标本结果分析/例

LiPA	MGIT 960 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	274	5	279
阴性	9	191	200
合计	283	196	479

注: LiPA 为线性探针技术, MGIT 960 法为 BACTEC™ MGIT 960 快速液体法;两种方法检测的阳性率比较, $\chi^2 = 0.64$, $P = 0.424$

2.2 LiPA 检测利福平和异烟肼药物敏感性的效能分析 LiPA 和 MGIT 960 法两种方法检测 MTBC 均阳性的标本有 274 例,以 MGIT 960 法为标准, LiPA 检测利福平和异烟肼的灵敏度分别为 95.18% (79/83)、81.61% (71/87), 特异度分别为 96.34% (184/191)、95.72% (179/187), 两者检测的两药耐药率均差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见表 2。且经 Kappa 一致性检验, 利福平、异烟肼耐药 Kappa = 0.906、0.793, 均 $P < 0.001$, 一致性均较好。

2.3 突变位点和基因突变类型 LiPA 检测出的 274 株 MTBC 中, 利福平耐药 86 株, 占 31.387% (86/274), 其中突变频率最高的位点是 S531L, 占总耐药的 62.791% (54/86), 其次是 H526D, 占 15.116% (13/

86), D516V 占 6.977% (6/86)。79 株异烟肼耐药株中, 单独 katG 基因突变占 84.810% (67/79), inhA 基因突变占 7.595% (6/79), katG 和 inhA 基因同时突变占 7.595% (6/79), KatG 基因常见突变位点是 S315T, inhA 基因常见突变位点是 C15T。见表 3。

表 2 两种方法进行耐利福平、异烟肼药物敏感性检测特异度和灵敏度分析/例

LiPA	MGIT 960法		合计
	耐药	敏感	
利福平			
耐药	79	7	86
敏感	4	184	188
合计	83	191	274
异烟肼			
耐药	71	8	79
敏感	16	179	195
合计	87	187	274

注: LiPA 为线性探针技术, MGIT 960 法为 BACTEC™ MGIT 960 快速液体法, 两者利福平、异烟肼耐药率比较, $\chi^2 = 0.36$ 、 2.04 , $P = 0.549$ 、 0.152

表 3 线性探针技术(LiPA)检测出的 274 株结核分枝杆菌复合群(MTBC)耐药基因 rpoB、katG 和 inhA 突变谱的分布情况

耐药基因	突变条带点	突变位点	耐药/株(%)
利福平			
ropB	WT1, 2	505~509, 509~513	2(2.326)
ropB	WT2, 3	510~513, 510~517, D516V	1(1.163)
ropB	WT3, 4	510~517, 513~519, D516V	1(1.163)
ropB	WT4, 5	513~519, 516~522, D516V	4(4.651)
ropB	WT7	526~529	4(4.651)
ropB	WT7-M2a	526~529, H526Y	6(6.977)
ropB	WT7-M2b	526~529, H526D	13(15.116)
ropB	WT8-M3	530~533, S531L	50(58.139)
ropB	WT3-M3	513~519	1(1.163)
ropB	M3	S531L	4(4.651)
合计			86(100.000)
异烟肼			
KatG	WT1-M1	315, S315T	67((84.810)
inhA	WT1-M1, M1	C15T	6(7.595)
KatG+inhA	WT1-M1+ WT1-M1	S315T, C15T	6(7.595)
合计			79(100.000)

3 讨论

据 WHO《2018 年全球结核病报告》, 2017 年全球共有 1 000 万例新发结核病例, 其中耐药结核病有 56 万例, 耐药结核病中 MDR-TB 约占 82%。加强结核病实验室能力建设, 提升 MDR-TB 的检测能力能够加大病人的发现力度, 更为有效地实施 MDR-TB 控制策略。LiPA 主要检测利福平和异烟肼的 3

个主要耐药基因(rpoB、katG 和 inhA)。

本研究以 MGIT 960 培养法为标准, LiPA 检测 MTBC 有较高的灵敏度和特异度, 分别为 96.82%、97.45%, 能为临床疑似肺结核病人的快速分子诊断提供新的可靠的检测方法, 且将报告时间缩短至 1 d, 说明 LiPA 的检测效能大大提高^[6-7]。本研究发现有 9 例病例 LiPA 阴性而 MGIT 960 培养阳性, 用其阳性培养物重新进行 LiPA 检测, 均能得出阳性结果。考虑可能原因是(1) LiPA 检测过程中, 痰标本中存在 Taq 酶的抑制物抑制扩增反应; (2) 痰标本前消化处理过程中氢氧化钠消化过度引起 MTBC 损伤或丢失, 造成 DNA 提取量不足, 呈阴性结果, 其阳性培养物含菌量高, DNA 提取量充足, 受抑制物影响小, 可以得到理想的条带结果。另外 5 例 MGIT 960 法培养阴性的病例而 LiPA 检测是阳性, 我们查其病历发现他们均为进行抗结核治疗有一段时间的结核病人, 可能痰标本中只有极少一部分死菌或者细胞壁已经破坏的 L 型菌, 故不能再在培养基上生长, 但其结核分枝杆菌的 DNA 还没能完全降解, 因此虽然培养阴性, 但是 LiPA 可以检测出阳性结果。

LiPA 可以高效检测 MTBC 对利福平和异烟肼的耐药性, 本研究以 MGIT 960 法为标准, 检测 MTBC 对利福平耐药灵敏度为 95.18% (79/83), 对异烟肼耐药灵敏度为 81.61% (71/87), 造成对异烟肼耐药灵敏度较低的可能原因是 LiPA 只能检测其 KatG 和 inhA 基因, 耐药相关性只能达到 70%~85%^[8], 不能覆盖异烟肼的全部耐药基因, 但是对其检测的特异度均超过 95%, 因此 LiPA 检测异烟肼耐药性靶基因还需要进一步研究。LiPA 检测利福平耐药中突变频率最高的是 S531L, 占 62.791% (54/86)、其次是 H526D (15.116%) 和 D516V (6.977%)。在异烟肼耐药株中, katG 基因突变占 84.810%, inhA 基因突变 7.595% (6/79), katG 和 inhA 基因同时突变 7.595% (6/79), KatG 基因常见的突变是 S315T, inhA 基因常见突变位点是 C15T。有的菌株单纯基因突变(ropB-M3, inhA-M1), 也有的基因突变同时伴有野生型基因的丢失(ropB-WT8-M3, inhA-WT1-M1)导致耐药, 不同地区或者同一地区不同时间段的结核分枝杆菌耐药株的基因突变类型和频率可能会因为受调查人群数量的范围而略有不同, 这与国内外的研究^[9-10]基本相似。

综上所述, 以 MGIT 960 法为标准, LiPA 诊断耐药结核病具有灵敏度高、特异度强、快速准确的特点, 为耐药结核病的早期发现和治疗提供了诊断依据。但 LiPA 操作技术和防污染措施要求非常严格,

必须符合国家验收合格的分子生物学实验室才能开展工作。

参考文献

- [1] 李波, 吴进凤, 欧喜超, 等. Xpert MTB/RIF、荧光染色镜检、改良罗氏培养在肺结核实验室诊断中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(7): 1165-1168.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007—2008)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 13-17.
- [3] MUTHURAJ M, SMITA SS, VIDYA RC, et al. Prevalence of mutations in genes associated with rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates [J]. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis, 2017, 8: 19-25.
- [4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2): 70-74.
- [5] 赵雁林, 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病实验室诊断技术培训课程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 184-189.
- [6] KOSTERA J, LECKIE G, ABRAYAYA K, et al. Performance of the Abbott RealTime MTB RIF/INH resistance assay when used to test Mycobacterium tuberculosis specimens from Bangladesh [J]. Infect Drug Resist, 2018, 11: 695-699.
- [7] 李强, 包训迪, 刘元, 等. MTBDRplus V2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.
- [8] 王洪秀, 杨景卉, 王暖, 等. GenoType MTBDRplus VER 20对痰样本结核分枝杆菌及其耐药性检测的应用评价[J]. 检验医学, 2017, 32(5): 410-414.
- [9] 刘厚明, 陈珊, 黄莎莎, 等. 某院结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药基因特征[J]. 中国感染控制杂志, 2018, 17(6): 490-495.
- [10] BRHANE M, KEBEDE A, PETROS Y, et al. Molecular detection of multi drug-resistant tuberculosis among smear-positive pulmonary tuberculosis patients in Jigjiga town, Ethiopia [J]. Infect Drug Resist, 2017, 10: 75-83.

(收稿日期: 2019-05-21, 修回日期: 2019-08-05)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.12.024

◇临床医学◇

炎症因子水平对不同程度烧伤的预后评估

韩亚龙, 刘文军, 刘军, 李武全, 魏迪南

作者单位: 昆明医科大学第二附属医院烧伤科, 云南 昆明 650000

摘要:目的 分析烧伤病人外周血炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-10(IL-10)与轻度、中度、重度、特重度等不同程度烧伤以及临床预后的关系。方法 前瞻性纳入昆明医科大学第二附属医院2016年2月至2019年2月烧伤病人, 依据烧伤严重程度分为轻度组、中度组、重度组、特重度组等四组, 同期纳入该院体检健康人群作为健康对照组, 监测烧伤后24 h内、第7天、第21天的外周血炎症因子IL-6、IL-8、IL-10水平, 分析各组间炎症因子分布特点和差异, 评估其对无感染、发生感染、脓毒症、死亡等预后价值。结果 共纳入研究对象307例, 其中, 轻度组62例, 中度组63例, 重度组62例, 特重度组60例, 健康对照组60例。重度组IL-6、IL-8、IL-10在入院24 h内[(138.3±51.1) ng/L、(90.5±81.1) ng/L、(55.7±10.8) ng/L]、第7天[(488.9±193.2) ng/L、(177.5±73.3) ng/L、(79.2±14.5) ng/L]的短期水平均明显高于健康对照组[24 h: (24.1±23.9) ng/L、(26.7±16.0) ng/L、(11.7±4.2) ng/L]($P < 0.05$), 在特重度组亦观察到类似结果。重度、特重度组IL-6[(125.74±24.6) ng/L、(244.4±134.0) ng/L]、IL-10[(57.5±18.5) ng/L、(98.5±47.6) ng/L]在第21天的长期水平明显高于轻度组[IL-6: (25.5±11.2) ng/L; IL-10: (13.8±7.5) ng/L]($P < 0.05$)。死亡组、脓毒症组病人IL-6、IL-8、IL-10短期水平升高显著($P < 0.05$), 死亡组平均水平最高, 且第21天仍处在较高水平。结论 重度、特重度烧伤病人IL-6、IL-8、IL-10升高明显, 在试验观察时间范围内高水平的IL-6、IL-8、IL-10均提示预后不良。

关键词: 烧伤; 白细胞介素-6; 白细胞介素-8; 白细胞介素-10; 预后

Analysis of inflammatory factors in the prognostic evaluation of burns with different severities

HAN Yalong, LIU Wenjun, LIU Jun, LI Wuquan, WEI Dinan

Author Affiliation: Burn Department, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650000, China

Abstract: Objective To explore the relationship between serum interleukin-6 (IL-6), serum interleukin-8 (IL-8), serum interleukin-10 (IL-10) of burn patients with mild, modest, severe, and extra-severe burns as well as their prognosis. **Methods** Burn patients treated in the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University from February 2016 to February 2019 were enrolled