

线性探针技术快速诊断本溪地区 耐多药肺结核效果评价

邓闯, 虞洋, 周玲玲, 赵庆成, 靳志平
本溪市疾病预防控制中心, 辽宁 本溪 117000

摘要: **目的** 评价线性探针技术(LPA)在本溪地区快速检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性的特异性和敏感性。

方法 采用传统罗氏培养法培养 2013 年 3 月-2014 年 6 月期间全市县区所有登记的 414 例涂阳肺结核患者痰标本, 获得菌株经比例法药物敏感性试验和线性探针技术检测利福平和异烟肼耐药性, 并以比例法药物敏感性试验为金标准分析线性探针方法的特异性和敏感性。 **结果** 经培养获得 394 株结核分枝杆菌菌株, 与比例法药物敏感性试验相比较, 线性探针技术检测利福平和异烟肼的特异性分别为 97.9% 和 96.6%, 敏感性分别为 91.1% 和 81.3%; 对耐多药检测的特异性和敏感性分别为 98.8% 和 89.9%。 **结论** 线性探针技术是一种快速、敏感、特异的诊断结核分枝杆菌利福平、异烟肼耐药和耐多药(MDR)的有效方法, 可在本溪地区推广应用。

关键词: 结核分枝杆菌; 耐多药; 线性探针; 药物敏感性试验

中图分类号: R378.91⁺1 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2016)11-1385-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.11.031

Evaluation on the line probe assay for rapid diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in Benxi region

DENG Chuang, YU Yang, ZHOU Ling-ling, ZHAO Qing-cheng, JIN Zhi-ping

Benxi Municipal Center for Disease Control and Prevention, Benxi, Liaoning 117000, China

Abstract: **Objective** To evaluate the specificity and sensitivity of the line probe assay in rapid detection of resistance to rifampin (RFP) and isoniazid (INH) in *Mycobacterium tuberculosis* in Benxi region. **Methods** Four hundred and fourteen sputum specimens from all registered smear-positive tuberculosis patients in the whole city were cultured by traditional Lwenstein-Jensen culture from March 2013 to June 2014. The positive cultures were examined by traditional drug sensitivity test, and the resistance to RFP and INH was determined by the line probe assay. The traditional drug sensitivity test as the golden standard was used to analyze the specificity and sensitivity of the line probe assay. **Results** Three hundred and ninety-four *Mycobacterium tuberculosis* strains were obtained. Compared with the traditional drug sensitivity test, the specificity and sensitivity of detecting resistance to RFP and INH and multi-drug resistance by the linear probe assay were 97.9% and 91.1%, 96.6% and 81.3%, 98.8% and 89.9% respectively. **Conclusions** The line probe assay is a rapid, sensitive, specific and effective method for the diagnoses of resistance to RFP and INH and multi-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. It can be popularized and applied in Benxi region.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Multi-drug resistance; Line probe; Drug susceptibility test

世界卫生组织(WHO)在1992年将结核分枝杆菌同时耐异烟肼和利福平定义为耐多药。耐多药结核病存在治疗周期长、治疗成本高和治愈率低等问题,严重危害人们的生命健康,为全世界结核防治的难题之一^[1],故耐多药结核患者的早期诊断尤为重要。目前在基层单位还是采用传统的药敏试验诊断耐多药,结果报告需2个月左右,致使诊疗时间延迟,影响

了防治效果。

HAIN Genotype MTBDRPlus(简称HAIN)是德国Hain Lifescience公司基于线性探针技术推出的一种通过检测结核分枝杆菌 *rpoB* 和 *katG/inhA* 基因突变以确定其是否对利福平和异烟肼耐药的诊断试剂,具有操作简便、仪器及检测费用相对较便宜的特点,可在一个工作日内报告耐药结果,被WHO推荐用于耐多药诊断^[2]。本次研究以传统的比例法药敏结果为金标准,探讨线性探针技术(LPA)在本地区的诊断价值。

基金项目: 全球基金耐多药肺结核防治项目(2013)

作者简介: 邓闯(1971-),男,满族,本科学历,副主任检验师,主要从事结核病检验工作。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2013 年 3 月~2014 年 6 月期间全市县区专科医院和结防机构所有的涂阳标本 414 例,每个涂阳病例留取即时痰、夜间痰和晨痰 3 份痰标本,于 4℃~8℃ 冰箱保存,3 d 内运送至市疾控中心结核病实验室,接到标本 24 h 内对每个涂阳病例挑选性状较好的 2 份痰标本按中国防痨协会《结核病诊断实验室检验规程》^[3] 进行培养,经对硝基苯甲酸初步菌种鉴定后共得到 396 株分枝杆菌菌株。

1.2 仪器设备和试剂

1.2.1 仪器设备 生物安全柜、涡旋震荡器、PCR 仪、Twcubator 杂交仪、恒温金属浴、超声破碎仪、高速离心机、磨菌瓶、标准麦氏比浊管和移液器(1 000、200、20、10 μl)等。

1.2.2 试剂 罗氏培养基、对硝基苯甲酸培养基(PNB)及药敏培养基由珠海贝索生物技术有限公司提供, HAIN Genotype MTBDRPlus 试剂盒及 Hotstar Taq 酶由生物梅里埃公司提供,所有试剂均按要求保存,有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 比例法药敏试验 用接种环挑取一环罗氏培养基上的菌落,磨菌后与标准麦氏管比浊制成 1 mg/ml 菌悬液,稀释成 10^{-2} 和 10^{-4} mg/ml,分别接种 RFP、INH 及对照罗氏固体培养基上,将 10^{-2} 浓度的菌液接种在 PNB 菌种鉴定培养基上,37℃ 培养 4 周,观察结果,药敏培养基上菌落数/对照培养基上菌落数的比值大于 1% 为耐药,否则为敏感。

1.3.2 HAIN 线性探针试验^[4] (1)核酸提取:取一环培养基上的菌落,加入 300 μl 无菌纯水中,95℃ 灭活 20 min 后,超声破碎 15 min、12 000 rpm 离心 5 min,取上清移至另一管中。取 5 μl 用于 PCR 扩增,剩余 20℃ 保存备用。(2)PCR 扩增:扩增体系 45 μl,其中引物和核苷酸混合物(PNM) 35 μl、10xBuffer 5 μl、MgCl₂ 2 μl、无菌水 3 μl 和 0.2 μl Taq 酶,提取的 DNA 模板 5 μl。扩增程序为:95℃ 15 min; 95℃ 30 s, 58℃ 2 min, 10 个循环; 95℃ 25 s, 53℃ 40 s, 70℃ 40 s, 20 个循环; 70℃ 8 min。(3)杂交:按 HAIN Genotype MTBDRPlus 试剂说明书操作,取 20 μl 扩增产物经化学裂解后,与试条上的探针杂交,通过酶显色反应检测杂交结果。(4)结果判读:试纸条上固定有 27 个检测探针,有 4 个区域,分别为质控区、ropB 基因检测区、katG 基因检测区、inhA 基因检测区。质控条带正常,ropB 基因野生位点任意一条缺失或突变位点任意一条阳性则对利福平耐药,反之对利福平敏感。katG 基

因、inhA 基因与 ropB 基因判定方法相同,如果 TUB 质控条带不显色,表示所试细菌不属于结核分枝杆菌复合群,不能用本试验系统判读结果。见图 1。

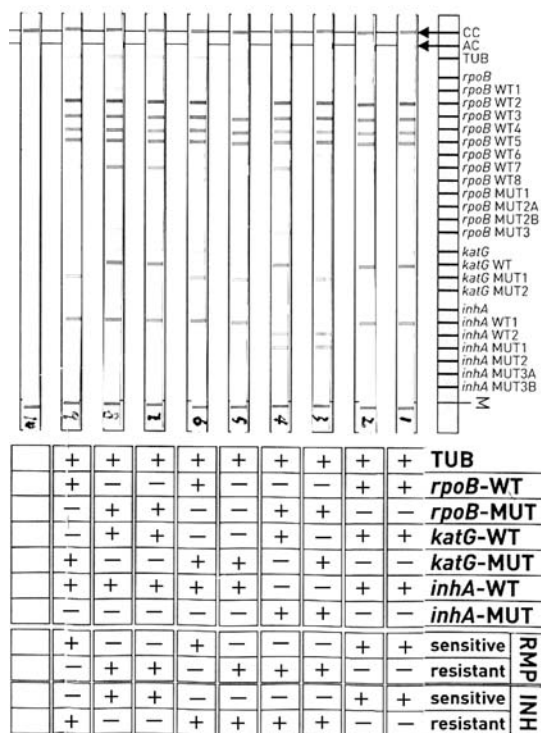


图 1 RFP 和 INH 耐药基因突变检测实例

1.3.3 质量控制 比例法结核分枝杆菌药敏试验经国家结核病参比实验室熟练度测试考核为合格。在国家结核病参比实验室组织的结核病分子诊断技术能力测试中,成绩合格。HAIN 线性探针试验中质控条带正常显色。

1.3.4 统计分析 利用 SPSS13.0 软件进行统计分析。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 比例法耐药结果 396 株分枝杆菌经初步菌种鉴定,2 株为非结核分枝杆菌。在 394 株结核分枝杆菌中,112 株耐 RFP,128 株耐 INH,89 株同时耐 RFP 和 INH,两药皆敏感 243 株。

2.2 HAIN 线性探针检测结果 经检测 396 株待测菌株中 2 株不是结核分枝杆菌,其余 394 株结核分枝杆菌中 108 株耐 RFP,113 株耐 INH,80 株同时耐 RFP 和 INH,两药皆敏感 253 株。

2.3 传统药敏结果与线性探针检测结果对比 在 396 株待检菌株中,两种方法均排除 2 株非结核分枝杆菌、确证 394 株为结核分枝杆菌,结果一致。以比例法药敏为金标准,线性探针技术检测利福平和异烟肼的特异性为 97.9% (276/282) 和 96.6% (257/266),敏

感性为 91.1% (102/112) 和 81.3% (104/128) , 见表 1。经 Kappa 检验,利福平和异烟肼耐药检测的 K 值分别为 0.899 和 0.803, $P<0.0001$ 。而以比例法药敏为金标准,线性探针技术检测耐多药的特异性为 98.8% (240/243) ,敏感性为 89.9% (80/89) 。

表 1 HAIN 检测结果与传统罗氏药敏结果比较

HAIN 检测结果	罗氏药敏结果			
	RFP		INH	
	敏感	耐药	敏感	耐药
敏感	276	10	257	24
耐药	6	102	9	104
合计	282	112	266	128

3 讨 论

传统的耐药肺结核实验室诊断是对患者的痰标本进行结核菌的培养和药敏试验。由于分枝杆菌生长缓慢,而药敏试验以细菌生长为终点判定结果,所以耗时较长,需 2 个月左右,导致耐药肺结核不能得到及时有效的治疗,不仅可能致使自身耐药谱增加,甚至广泛耐药,而且可导致排菌时间延长、传染他人几率增加,社会危害性极大。因此探索、践行快速耐药肺结核的诊断方法尤为迫切。

近年来,随着分子生物技术的迅速发展,结核分枝杆菌的分子耐药机制渐渐清晰^[5-6],相继出现了基因测序、基因芯片、荧光定量 PCR、熔解曲线分析法、分子信标法及线性探针技术等快速检测方法^[7-9]。这些方法大大缩短了报告时间,但大都设备昂贵、检测费用高,难以推广。

本研究采用的线性探针杂交技术是利用反向斑点杂交原理,通过多重 PCR 扩增,将扩增产物与固定在试条上的特异探针杂交,经酶显色条带判读 *rpoB* 和 *katG/inhA* 是否突变,从而判断利福平和异烟肼的耐药。该方法操作简便,可在一个工作日内完成耐药检测,大大缩短了药敏的报告时间。该项技术可利用涂阳痰标本直接提取 DNA 进行线性探针检测,只是痰液中菌量少时,最后的杂交显色浅不易判读。为使评价结果更准确,故本文首先对涂阳标本进行培养得到菌株,而后再将菌株的线性探针技术检测结果与传统比例法药敏试验进行比对。实验结果表明,两种方法均排除了 2 例非结核分枝杆菌,验证了线性探针检测可准确鉴定结核分枝杆菌、排除非结核分枝杆菌。而

以比例法药敏实验为金标准评估线性探针技术检测利福平和异烟肼耐药性的结果为,其特异性分别是 97.9% 和 96.6%,敏感性分别是 91.1% 和 81.3%,与李强等的研究报道接近^[10];而检测耐多药的特异性和敏感性为 98.8% 和 89.9%,与桂晓红等^[11]报道接近。其中线性探针检测 INH 耐药的敏感性较 RFP 低,可能与 INH 的耐药基因检测位点少有关。

本研究结果显示线性探针技术是一种快速、敏感和特异的耐多药肺结核诊断方法,可为早期诊断耐多药肺结核提供依据,赢得最佳治疗时间;加之检测费用亦较传统药敏试验低^[12],故该技术值得推广。如有必要,可再做传统药敏试验加以验证。

但线性探针检测对实验室条件和实验室技术人员要求较高,否则易污染,影响实验结果,故目前只能在市级及以上级别实验室中进行,县级实验室尚很难具备开展条件。

参考文献

[1] 万康林. 中国结核病流行新特点及挑战[J]. 疾病监测, 2008, 23 (11): 667-670.

[2] Palomino JC, Martin A, Portaels F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods[J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(8): 754-762.

[3] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程 [M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 13-56.

[4] 中国疾病预防控制中心国家结核病参比实验室. 线性探针耐多药检测方法应用评估实施细则 [M]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010: 37-47.

[5] 周志红, 王华洪. *rpoB* 基因突变与结核分枝杆菌利福平耐药相关性研究[J]. 实用预防医学, 2013, 17(10): 1189-1191.

[6] 邓叶华, 向延根, 马小华, 等. 结核分枝杆菌耐利福平和异烟肼分子机制的研究进展[J]. 实用预防医学, 2015, 22(9): 1148-1151.

[7] 柳正卫, 黄玉, 赵雁林. 结核分枝杆菌基因突变检测方法研究进展 [J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 748-751.

[8] 范齐文, 吴文娟. 结核病实验室诊断技术 [J]. 微生物与感染, 2012, 7(3): 190-196.

[9] 单万水, 单金岚, 詹能勇, 等. DNA 芯片快速检测耐利福平结核分枝杆菌 *ropB* 基因突变[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(4): 680-682.

[10] 李强, 赵雁林. 197 例临床结核分枝杆菌分离株的快速耐药性检测报告[J]. 中国防痨杂志, 2009, 31(12): 709-712.

[11] 桂晓红, 徐鹏, 赵明, 等. 耐多药结核病快速诊断试剂盒检测耐药结核分枝杆菌的评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(1): 43-45.

[12] 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.