

## • 论著 •

## MTBDRplus V2 用于诊断涂阴疑似肺结核患者的效果评价

李强 包训迪 刘元 赵冰 欧喜超 赵雁林

**【摘要】 目的** 评价 MTBDRplus V2 线性探针技术(简称“MTBDRplus V2”)用于诊断涂阴疑似肺结核患者的检测效能。**方法** 连续纳入 2014 年 1—12 月在安徽省胸科医院和西安市胸科医院就诊的涂阴疑似肺结核患者 1973 例,对其 1973 份痰标本同时开展 MTBDRplus V2 和 MGIT 960 快速液体培养(mycobacterial detection system, BACTEC™ MGIT™ 960, 简称“MGIT 960 培养法”),对培养阳性鉴定为结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)的菌株,开展利福平和异烟肼药物敏感性试验(简称“药敏试验”),对两种方法耐药检测结果不一致样本进行耐药相关基因测序验证。采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,两种方法对 MTBC 检出率的比较使用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。对利福平和异烟肼耐药基因检测的效能比较分析用敏感度、特异度进行效果评估。**结果** 1973 例涂阴疑似肺结核患者中,MTBDRplus V2 和 MGIT 960 培养法对 MTBC 的检出率分别为 27.67%(546/1973)和 26.76%(528/1973),差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.05, P = 0.974$ )。以 MGIT 960 培养法为标准,MTBDRplus V2 检测痰标本中 MTBC 的敏感度和特异度分别为 86.74%(458/528)和 93.84%(1356/1445)。以 MGIT 960 药敏试验检测利福平和异烟肼耐药结果为标准,MTBDRplus V2 检测利福平和异烟肼耐药性的敏感度分别为 94.34%(50/53)和 77.38%(65/84),特异度为 96.62%(372/385)和 98.02%(347/354)。**结论** MTBDRplus V2 可快速准确检测出涂阴疑似肺结核患者痰标本中的 MTBC,并可同时检测利福平和异烟肼对 MTBC 的药物敏感性,其检测结果敏感度和特异度高,对于结核病防控有很好的应用价值。

**【关键词】** 结核, 肺; 分子探针技术; 分枝杆菌, 结核; 痰; 药物敏感性试验; 评价研究

**A performance evaluation of MTBDRplus V2 for tuberculosis diagnosis in smear negative pulmonary tuberculosis suspects** LI Qiang, BAO Xun-di, LIU Yuan, ZHAO Bing, OU Xi-chao, ZHAO Yan-lin. National Tuberculosis Reference Laboratory, National Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: ZHAO Yan-lin, Email: zhaoyanlin@chinatb.org

**【Abstract】 Objective** To evaluate the performance of MTBDRplus version 2 (MTBDRplus V2) line probe assay for diagnosis of TB in the suspects with smear negative pulmonary tuberculosis. **Methods** The people who were clinically suspected to have smear negative pulmonary tuberculosis (PTB) and detected in Anhui Chest Hospital and Xi'an Chest Hospital from January 2014 to December 2014 were consecutively enrolled into this study. A total of 1973 smear negative PTB suspects were enrolled and one sputum specimen was collected from each of them to conduct MTBDRplus V2 and BACTEC™ MGIT™ 960 (MGIT 960) liquid culture, respectively. MGIT drug susceptibility testing (DST) for rifampin and isoniazid was also performed once the liquid culture was positive and *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) was identified. Finally, the drug resistance related genes sequencing was performed for the samples with inconsistent results of drug resistance between MTBDRplus V2 and MGIT DST to confirm the drug resistance status. SPSS 22.0 was used for statistic analysis and  $\chi^2$  test was used to compare the detection rate of MTBC by using the two diagnostic methods. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ . The sensitivity and specificity were applied to evaluate the performance of MTBDRplus V2 in the identification of MTBC and the detection of rifampicin and isoniazid resistance. **Results** Among 1973 enrolled cases who were suspected to have smear negative PTB, the identification rate of MTBC by using MTBDRplus V2 and MGIT 960 were 27.67%

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.07.006

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2014ZX10003002)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心 国家结核病参比实验室(李强、赵冰、欧喜超、赵雁林);安徽省胸科医院检验科(包训迪);西安市胸科医院检验科(刘元)

通信作者:赵雁林,Email: zhaoyanlin@chinatb.org

(546/1973) and 26.76% (528/1973), respectively. The difference has no statistical significance ( $\chi^2 = 0.05, P = 0.974$ ). Compared with MGIT 960, the sensitivity and specificity of MTBDRplus V2 in the identification of MTBC was 86.74% (458/528) and 93.84% (1356/1445), respectively. Compared with MGIT DST, the sensitivity of MTBDRplus V2 in the detection of rifampicin and isoniazid resistance was 94.34% (50/53) and 77.38% (65/84) respectively, and the specificity in the detection of rifampicin and isoniazid resistance was 96.62% (372/385) and 98.02% (347/354), respectively. **Conclusion** MTBDRplus V2 is a rapid and reliable method in the diagnosis of MTBC among smear negative PTB suspects. At the same time, it also can tell us whether the patients diagnosed as having MTBC are susceptible to rifampin and isoniazid or not, and both its sensitivity and specificity of drug resistance detection are high. Thus, this method has a good application value in the TB control and prevention.

**【Key words】** Tuberculosis, pulmonary; Molecular line probe assay; *Mycobacterium tuberculosis*; Sputum; Drug susceptibility testing; Evaluation studies

结核病是严重危害公众健康的全球性公共卫生问题,每年数百万例感染患者,死亡患者在感染性疾病中居第二位<sup>[1]</sup>。中国是全球第三大结核病高负担国家,结核病发病患者始终居传染病前列<sup>[1]</sup>。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查结果显示,人群中活动性肺结核患病率没有明显下降,但涂阴患者比例大幅度下降<sup>[2]</sup>。由于缺乏有效的诊断涂阴结核病的病原学检测方法,使涂阴结核病特别是耐药结核病患者不能得到及时有效的诊断和治疗。

MTBDRplus V1(Hain Lifescience,德国)是一种可以通过反向探针杂交技术快速检测样本中结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC),以及利福平和异烟肼耐药性的分子技术,报告时间短(6~8 h),近几年在全球范围已广泛应用<sup>[3-6]</sup>,2008 年被 WHO 推荐用于涂阳肺结核患者的耐药诊断<sup>[7]</sup>。与 MTBDRplus V1 相比,MTBDRplus V2(Hain Lifescience,德国)极大提高了检测样本中 MTBC 的敏感度,可直接对涂阴肺结核患者的痰标本进行病原学检测<sup>[8]</sup>。然而,目前国内尚没有关于 MTBDRplus V2 用于临床诊断的研究报道。本研究以涂阴疑似肺结核患者为研究对象,评价该技术用于诊断涂阴疑似肺结核患者的应用价值,为涂阴疑似肺结核患者的诊断提供科学依据。

## 材料和方法

### 一、患者来源

连续纳入 2014 年 1—12 月在安徽省胸科医院和西安市胸科医院就诊的胸部 X 线表现不典型、咳嗽咯痰>2 周、有或无肺结核临床症状的连续 3 次痰涂片镜检抗酸杆菌阴性(简称“涂阴”)的疑似肺结核患者 1973 例(研究中使用临床剩余痰),其中安徽省胸科医院 966 例(份),西安市胸科医院 1007 例(份)。

### 二、实验室检测

1. 痰标本处理:痰标本采用中和离心法去污染

处理,按照实验室标准化流程<sup>[9]</sup>,采用 N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH (NALC-NaOH)消化液处理,消化后的菌液沉淀重悬于 2 ml 的磷酸盐缓冲液中,分装两份分别进行 BACTEC MGIT 960 快速液体培养(mycobacterial detection system, BACTEC™ MGIT™ 960,简称“MGIT 960 培养法”)和 MTBDRplus V2 线性探针技术(简称“MTBDRplus V2”)检测。

2. MGIT 960 培养法和药物敏感性试验(简称“药敏试验”):加入 0.5 ml 处理后的痰标本至 MGIT 960 培养管(含 0.8 ml OADC 营养添加剂)中,对培养阳性鉴定为 MTBC 的菌株,严格按照操作手册将其加入含有利福平(1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )和异烟肼(0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )药物的培养管中,开展利福平和异烟肼的耐药检测。

3. MTBDRplus V2 检测:实验在 4 个独立房间进行,包括试剂准备间、模版制备区、扩增区和杂交区。实验操作严格按照 MTBDRplus V2 操作说明,取 0.5 ml 处理后的痰标本 13 000 $\times g$  离心 5 min,弃上清,沉淀用 100  $\mu\text{l}$  分子级双蒸水悬浮,95  $^{\circ}\text{C}$  水浴 20 min 提取核酸 DNA 备用;每个样本取 5  $\mu\text{l}$  核酸 DNA 加入含有 35  $\mu\text{l}$  AM-B 和 10  $\mu\text{l}$  AM-A 试剂的扩增体系中(Hain, MTBDRplus V2 试剂盒),PCR 扩增 40 个循环;取 20  $\mu\text{l}$  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。

4. 测序:对两种方法耐药检测结果不一致的样本进行耐药相关基因测序验证。采用 16S rRNA 基因测序进行结核分枝杆菌菌种鉴定, *rpoB* 基因测序用于利福平耐药基因检测, *katG* 和 *inhA* 用于异烟肼耐药基因检测。扩增产物由天一辉远生物技术有限公司进行单向测序,序列提交至美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)做同源性比较或多序列比对,引

物序列见表 1。

### 三、统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,对 MTBC 检出率的比较使用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。MGIT 960 培养法和 MTBDRplus V2 对 MTBC、利福平和异烟肼耐药基因检测效能的比较分析用敏感度、特异度进行效果评估。

## 结 果

### 一、两种方法对 MTBC 检出率的比较

MTBDRplus V2 和 MGIT 960 培养法对 MTBC 检出率分别为 27.67% (546/1973) 和 26.76% (528/1973),两种方法检出率差异无统计学意义

( $\chi^2 = 0.05, P = 0.974$ ) (表 2)。

### 二、两种方法对 MTBC 检测效能的比较分析

以 MGIT 960 培养法为标准,MTBDRplus V2 检测 MTBC 的敏感度和特异度分别为 86.74% (458/528) 和 93.84% (1356/1445) (表 3)。

### 三、两种方法对利福平耐药基因检测效能比较分析

以 MGIT 960 药敏试验检测利福平耐药结果为标准,MTBDRplus V2 检测利福平耐药性的敏感度为 94.34% (50/53),特异度为 96.62% (372/385),不同研究现场数据差异不大 (表 4)。对利福平基因型和表型耐药结果不一致的 16 例样本进行 *rpoB* 基因测序,结果显示 12 例样本的测序结果与 MTBDRplus V2 检测结果一致,一致率为 75.00%。

表 1 耐药基因测序引物序列

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
16S rRNA	16S-f	GGCCTAACCTCGGGAGGGAG	440
	16S-r	CCCAGGCATATCGCAGCCTC	
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> -f	ACCGACGACATCGACCACTT	430
	<i>rpoB</i> -r	GTACGGCGTTTCGATGAACC	
<i>katG</i>	<i>katG</i> -f	AATCGATGGGCTTCAAGACG	500
	<i>katG</i> -r	CTCGTAGCCGTACAGGATCTCG	
<i>inhA</i>	<i>inhA</i> -f	CCTCGCTGCCAGAAAGGGA	248
	<i>inhA</i> -r	ATCCCCGGTTTCCTCCGGT	

表 2 两家医院 MTBDRplus V2 和 MGIT 960 培养法对涂阴疑似肺结核患者 MTBC 检出率的比较

医院名称	MTBDRplus V2		MGIT 960 <sup>a</sup>		$\chi^2$ 值	P 值
	例数	检出率 (%)	例数	检出率 (%)		
安徽省胸科医院(966 例)	290	30.02	276	28.57	0.49	0.484
西安市胸科医院(1007 例)	256	25.42	252	25.02	0.04	0.837
合计(1973 例)	546	27.67	528	26.76	0.05	0.974

注 <sup>a</sup>:培养阳性菌株进行测序鉴定

表 3 两家医院 MTBDRplus V2 对 MTBC 检测的敏感度和特异度

医院名称	MTBDRplus V2	MGIT 960 培养法(例)			敏感度 (%)	特异度 (%)
		阳性(528 例)	阴性(1445 例)	合计(1973 例)		
安徽省胸科医院	阳性	241	49	290	87.32	92.90
	阴性	35	641	676		
	小计	276	690	966		
西安市胸科医院	阳性	217	40	257	86.11	94.70
	阴性	35	715	750		
	小计	252	755	1007		
合计	阳性	458	89	547	86.74	93.84
	阴性	70	1356	1426		

表 4 两家医院 MTBDRplus V2 进行利福平药物敏感性检测的敏感度和特异度

医院名称	MTBDRplus V2	MGIT 960 培养法(例)			敏感度 (%)	特异度 (%)
		耐药(53 例)	敏感(385 例)	合计(438 例)		
安徽省胸科医院	耐药	28	6	34	93.33	97.12
	敏感	2	202	204		
	小计	30	208	238		
西安市胸科医院	耐药	22	7	29	95.65	96.05
	敏感	1	170	171		
	小计	23	177	200		
合计	耐药	50	13	63	94.34	96.62
	敏感	3	372	375		

表 5 两家医院采用 MTBDRplus V2 进行异烟肼药物敏感性检测的敏感度和特异度

医院名称	MTBDRplus V2	MGIT 960 培养法(例)			敏感度 (%)	特异度 (%)
		耐药(84 例)	敏感(354 例)	合计(438 例)		
安徽省胸科医院	耐药	29	7	36	87.88	96.59
	敏感	4	198	202		
	小计	33	205	238		
西安市胸科医院	耐药	36	0	36	70.59	100.00
	敏感	15	149	164		
	小计	51	149	200		
合计	耐药	65	7	72	77.38	98.02
	敏感	19	347	366		

四、两种方法对异烟肼耐药基因检测效能比较分析

以 MGIT 960 培养法检测异烟肼耐药结果为标准,MTBDRplus V2 检测异烟肼的敏感度为 77.38%(65/84),特异度为 98.02%(347/354)(表 5)。对异烟肼基因型和表型耐药结果不一致的 26 例样本进行 *katG* 和 *inhA* 基因测序,结果显示,23 例样本的测序结果与 MTBDRplus V2 检测结果一致,一致率 88.46%。

讨 论

本研究率先通过临床对照研究将有前景的 MTBDRplus V2 检测方法用于涂阴疑似肺结核疾病的诊断中,结果表明 1973 例患者中,MTBDRplus V2 对 MTBC 检出率为 27.67%(546/1973),与 MGIT 960 培养法的检出率 26.76%(548/1973)相比,差异无统计学意义( $\chi^2=0.05, P=0.974$ ),但 MTBDRplus V2 检测方法将报告时间从 15 d 缩短到了 1 d<sup>[10]</sup>,与本研究一致。此外,以 MGIT 960 培

养法为标准,MTBDRplus V2 检测 MTBC 的敏感度、特异度分别为 86.74%(458/528)和 93.84%(1356/1445),说明其检测效能高。MTBDRplus V2 在检测 MTBC 的同时还可以检测 MTBC 对利福平和异烟肼的耐药性。与 MGIT 960 药敏试验结果相比,MTBDRplus V2 检测利福平耐药性的敏感度达到 94.34%(50/53)以上,而国内研究报道,MTBDRplus V1 检测利福平耐药性的敏感度仅 88%<sup>[10]</sup>。对利福平基因型和表型耐药结果不一致患者样本进行利福平耐药相关基因(*rpoB* 基因)耐药决定区的测序验证,MTBDRplus V2 和测序结果一致率为 75.00%(12/16),结果与国内相关研究报道相符<sup>[11]</sup>,但低于国外文献报道<sup>[12]</sup>,可能与不同国家流行菌株不同有关。

与 MGIT 960 药敏试验结果相比,MTBDRplus V2 检测异烟肼耐药性的敏感度为 77.38%(65/84),造成敏感度较低的原因,可能是由于其检测的耐药相关基因为 *katG* 和 *inhA* 基因,这 2 个基因与异烟肼耐药相关性一般为 70%<sup>[13]</sup>。对异烟肼基因型和

表型耐药结果不一致的患者样本进行异烟肼耐药相关基因(*katG* 和 *inhA* 基因)耐药决定区的测序验证, 88.46% (23/26) 的患者样本的测序结果和 MTBDRplus V2 的检测结果一致。有研究报道 *oxyR-ahpC* 等基因与异烟肼耐药有一定相关性<sup>[14]</sup>。本研究中, MTBDRplus V2 检测异烟肼耐药性的结果为“敏感”而 MGIT 960 培养法检测异烟肼耐药性的结果为“耐药”的 19 例样本中, 测序结果均未发现 *katG* 和 *inhA* 存在突变。这一结果提示, MTBDRplus V2 检测异烟肼耐药性的靶基因需要进一步完善。

综上所述, MTBDRplus V2 检测 MTBC 的敏感度和特异度高、时间短, 诊断涂阴疑似肺结核的可靠性强, 同时可以准确检测利福平和异烟肼的耐药性, 对指导涂阴疑似肺结核的防控具有重要意义。与其他分子检测技术如 GeneXpert MTB/RIF 和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)等技术相比, MTBDRplus V2 对实验室要求较高, 需要具备有 4 个独立的检测区域, 适合在地市级以上结核病诊疗机构的实验室开展。

志谢 安徽省胸科医院和西安市胸科医院的结核科医生对本研究做出了杰出贡献

#### 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] Wang L, Zhang H, Ruan Y, et al. Tuberculosis prevalence in China, 1990—2010; a longitudinal analysis of national survey data. *Lancet*, 2014, 383(9934): 2057-2064.
- [3] Lacombe A, Garcia-Sierra N, Prat C, et al. GenoType MTBDRplus assay for molecular detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(11): 3660-3667.
- [4] Bang D, Bengard Andersen A, Thomsen VO. Rapid genotypic detection of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(7): 2605-2618.
- [5] 李强, 欧喜超, 夏辉, 等. Genotype MTBDRplus 快速耐药诊断方法在地市级结核病医院应用的评估研究. *中国预防医学杂志*, 2013, 14(1): 35-38.
- [6] 陈琛, 马远征. 分子线性探针测定法在结核病诊断中的研究进展. *中国防痨杂志*, 2016, 38(3): 218-221.
- [7] World Health Organization. Policy statement: Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva: World Health Organization, 2008.
- [8] Crudu V, Stratan E, Romancenco E, et al. First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(4): 1264-1269.
- [9] Kent PT, Kubica GP. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta GA: Centers for Disease Control and Prevention, 1985.
- [10] Li Q, Dong HY, Pang Y, et al. Multicenter evaluation of the molecular line probe assay for multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* detection in China. *Biomed Environ Sci*, 2015, 28(6): 464-467.
- [11] Pang Y, Lu J, Wang Y, et al. Study of the rifampicin monoresistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(2): 893-900.
- [12] Kumar P, Balooni V, Sharma BK, et al. High degree of multidrug resistance and hetero-resistance in pulmonary TB patients from Punjab state of India. *Tuberculosis (Edinb)*, 2014, 94(1): 73-80.
- [13] Rufai SB, Kumar P, Singh A, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF with line probe assay for detection of rifampin-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(6): 1846-1852.
- [14] Zhang Z, Lu J, Liu M, et al. Genotyping and molecular characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Infect*, 2015, 70(4): 335-345.

(收稿日期: 2016-02-04)

(本文编辑: 孟莉 范永德)