

· 综述 ·

分子检测技术诊断骨关节结核及其耐药性的研究进展

王桂荣 黄海荣

【摘要】 骨关节结核约占肺外结核的 15%，由于症状不典型，易导致漏诊、误诊。细菌学检查是结核病诊断的金标准，但传统实验室方法诊断骨关节结核的敏感度低、耗时长，不能满足骨关节结核快速诊断的需要。近年来分子诊断技术在结核病诊断中发挥越来越重要的作用，作者综述了基因芯片技术、线性探针技术和 Xpert MTB/RIF 技术诊断骨关节结核及其耐药性的研究进展，以便为选择骨关节结核实验室诊断方法提供依据。

【关键词】 结核，骨关节； 分子诊断技术； 结核，抗多种药物性； 综述

Research progress on molecular tests in diagnosis of bone and joint tuberculosis and detection of drug resistance
WANG Gui-rong, HUANG Hai-rong. National Clinical Laboratory on Tuberculosis, Beijing Key Laboratory for Drug Resistant Tuberculosis Research, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Institute, Beijing 101149, China

Corresponding author: HUANG Hai-rong, Email: huanghairong@tb123.org

【Abstract】 Bone and joint tuberculosis (BJTB) accounts for about 15% of extrapulmonary TB. The atypical clinical symptoms often caused its misdiagnosis. Although, bacteriological confirmation of *M. tuberculosis* remains as a gold standard for the diagnosis of TB. Conventional techniques are not sensitive enough and time consuming, which can't provide rapid BJTB diagnosis. Nowadays, molecular tests play an important role in TB rapid diagnosis. The progresses on DNA microarray, molecular line probe assay and Xpert MTB/RIF assay in diagnosis of BJTB are discussed, which will provide a reliable basis for selecting laboratory examination methods for BJTB.

【Key words】 Tuberculosis, osteoarticular; Molecular diagnostic techniques; Tuberculosis, multidrug-resistant; Review

结核病(tuberculosis, TB)是一种严重危害人类健康的慢性传染性疾病,可累及全身几乎所有的器官和组织。结核病在全球导致死亡的感染性疾病中排名第二,仅次于人类获得性免疫缺陷综合征^[1]。据 WHO《2015 年全球结核病年报》报告,2014 年我国新增结核病患者 93 万例,其中 22% 为肺外结核患者^[1]。我国也是全球 27 个耐多药结核病(multi-drug-resistant tuberculosis, MDR-TB)高负担国家之一,中国的 MDR-TB 患者例数占世界的 17.33%^[1-2]。骨关节结核绝大多数继发于肺结核,结核分枝杆菌通过血行或淋巴系统传播至骨关节,发生于供血丰富、负重程度大的骨质或活动较多的关节滑膜。骨关节结核占有结核病患者例数的 3%~5%,占肺外结核患者例数的 15%^[3]。患者若长期得不到有效治疗,会大大增加后遗症风险,如脊柱弯曲、棘突隆起、背部“驼峰”畸形、截瘫等,这些后遗症将给患者造成终生

身体和精神上的痛苦^[4]。因此,在 MDR-TB 高负担国家中,快速诊断骨关节结核及其耐药性,对骨关节结核的早期诊断和早期治疗,以及对结核病疫情的控制均具有重要意义。

由于骨关节结核临床表现不典型、病变位置深、标本不易获得,加之病灶含菌量少,给骨关节结核的诊断带来了严峻挑战。细菌学检查是结核病诊断的金标准,但传统实验室诊断方法中脓液涂片抗酸染色阳性率为 10%~30%^[5],脓液结核分枝杆菌培养阳性率为 10%~60%^[6],而且耗时较长,不能满足骨关节结核快速诊断的需要。准确及时的结核分枝杆菌耐药检测是指导临床早期开展个体化治疗、控制结核病流行的前提。而传统药物敏感性试验(简称“药敏试验”),从培养到获得药敏试验结果需 8~12 周,不能满足耐药骨关节结核的早期治疗。以 PCR 技术为基础的分子诊断技术在快速诊断结核病及其耐药性中已发挥重要作用,而且该领域仍在不断改进和发展中,使其操作更加简便、成本更加低廉。笔者将综述常用分子检测技术诊断骨关节结核及其耐药性的研究进展。

一、基因芯片技术

基因芯片技术的基本原理是通过微阵列技术将多种 DNA 探针有序地、高密度地排列在玻璃片或纤维膜等载体上,然后与标记的样品杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度,进而获取样品分子的数量和序列信息^[7]。基因芯片技术作为一种高通量自动化检测技术,在病原微生物分子

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.08.015

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养项目(2014-3-084);首都医科大学基础-临床科研合作基金(16JL75)

作者单位:101149 首都医科大学附属北京胸科医院 北京市结核病胸部肿瘤研究所 国家结核病临床实验室 北京市耐药结核病研究重点实验室

通信作者:黄海荣,Email:huanghairong@tb123.org

诊断方面可用于菌种鉴定、分型、诊断、耐药性检测等多个领域,具有快速、准确、高通量、自动化程度高等优点。Zhang 等^[8]评估了 CapitalBio™ 基因芯片诊断脊柱结核及其对利福平和异烟肼的耐药情况,结果表明与 BACTEC MGIT 960 系统相比, CapitalBio™ 基因芯片诊断脊柱结核的灵敏度为 93.55%,检测利福平耐药的灵敏度为 88.9%,特异度为 90.7%;检测异烟肼耐药的灵敏度为 80.0%,特异度为 91.0%。刘军兰等^[9]报道基因芯片检测关节液中结核分枝杆菌的准确率为 86.44%。程鹏等^[10]报道采用基因芯片技术对脊柱结核临床分离株进行检测,发现对链霉素、乙胺丁醇、左氧氟沙星、阿米卡星和卷曲霉素耐药的灵敏度分别为 90.36%、61.90%、94.59%、66.00%和 65.52%,其对应的特异度分别为 70.37%、58.11%、58.00%、91.95%和 80.56%;在 26 株全敏感菌株中,对 5 种抗结核药物耐药检测的特异度均为 100%。可见基因芯片法诊断骨关节结核及结核分枝杆菌对一线、二线抗结核药物耐药检测的灵敏度、特异度均较高。

基因芯片技术的优点:特异度高、灵敏度高、检测快速、可实现高通量检测;缺点:需要特殊仪器及相关软件分析系统、结果判断需要较高水平的专业人员、自动化程度不够易造成交叉污染等。与痰标本和结核分枝杆菌临床分离菌株相比,骨关节结核临床标本具有异质性大、标本含菌量少、标本处理难度大等特点,因此应用基因芯片技术诊断骨关节结核及其耐药性时,标本的处理较复杂。目前,分子检测技术在结核病尤其是耐药结核病的诊断中获得越来越多的重视,然而分子检测技术仍无法完全代替传统方法。基因芯片技术可与传统方法结合使用,指导临床开展早期、有效化疗。

二、线性探针技术

线性探针技术(line probe assay, LPA)的原理是通过应用生物素标记的特异引物进行靶核酸(DNA)的扩增,并将扩增产物变性后与固定在尼龙膜上的特异寡核苷酸探针杂交,通过酶联免疫显色法显示结果,1 次杂交可以检测多种靶序列^[11]。比较有代表性的线性探针技术试剂盒有 INNO-LPA(Innogenetics, Zwijnaarde, Belgium)、GenoType MTBDRplus(Hain Lifescience, Nehren, Germany)、GenoType MTBDRsl(Hain Lifescience, Nehren, Germany)、AID(AID Diagnostika, Germany)等。INNO-LPA 是最早应用于临床的 LPA 试剂盒,可用于结核分枝杆菌临床分离株和涂阳痰标本的结核分枝杆菌及其利福平耐药检测^[12]。GenoType MTBDRplus 试剂盒可用于检测结核分枝杆菌及异烟肼和利福平耐药,2008 年 WHO 推荐 GenoType MTBDRplus 试剂盒用于涂阳肺结核患者的结核分枝杆菌及其耐药性检测^[13]。GenoType MTBDRsl 试剂盒可检测结核分枝杆菌对氟喹诺酮类和二线注射类抗结核药物耐药情况^[14]。AID 试剂盒含有 3 个独立的检测模块,模块 1 可同时检测利福平和异烟肼是否耐药,模块 2 可同时检测氟喹诺酮类和乙胺丁醇是否耐药,模块 3 可同时检测卡那霉素、阿米卡星和链霉素是否耐药^[15]。

Meta 分析显示 GenoType MTBDRplus 试剂盒检测利福平耐药的灵敏度为 98.1%,特异度为 98.7%;检测异烟肼耐药的灵敏度为 84.3%,特异度为 99.5%^[16]。Gu 等^[17]的研究结果显示,以临床诊断参考标准为金标准,GenoType MTBDRplus 试剂盒诊断骨关节结核的灵敏度为 72%,特异度为 100%;以药敏试验结果为金标准,GenoType MTBDRplus 试剂盒检测利福平和异烟肼的灵敏度分别为 83.3%和 85.7%,特异度均为 100.0%。Molina-Moya 等^[18]的研究结果显示,AID 试剂盒与 BACTEC MGIT 960 系统检测异烟肼、利福平、氟喹诺酮类、乙胺丁醇、卡那霉素或卷曲霉素、链霉素耐药的一致性分别为 98.3%(59/60)、100.0%(60/60)、91.5%(54/59)、72.9%(43/59)、100.0%(51/51)和 98.0%(50/51)。Brossier 等^[14]报道 GenoType MTBDRsl 试剂盒(版本 2.0)检测氟喹诺酮类、卡那霉素、阿米卡星、卷曲霉素耐药的灵敏度分别为 94.8%、90.5%、91.3%和 83.0%。

LPA 技术的优点:具有较高的灵敏度和特异度,并可同时检测结核分枝杆菌及其耐药性,而且有些试剂盒可检测二线药物的耐药情况。缺点:LPA 所含探针数量有限,不能检测出一些基因区(如 *ahpC*、*kasA*、*furA* 等)的突变,可能出现假阴性结果^[19];对实验室环境及工作人员水平要求较高。

LPA 技术检测骨关节结核标本中结核分枝杆菌及其耐药性的灵敏度和特异度高,检测时间短,并且可同时检测结核分枝杆菌及其耐药性,可用于早期诊断骨关节结核及其耐药性。由于骨关节结核临床标本与痰标本性质差异较大,尽量留取多种骨关节结核标本,并优化标本前处理过程,可获得较好的检测结果^[20]。

三、Xpert MTB/RIF 技术

Xpert MTB/RIF 技术是以半巢式实时 PCR 技术为基础的全自动核酸扩增检测技术,以 *rpoB* 基因为靶基因,可在 2 h 内同时检测结核分枝杆菌和是否对利福平耐药^[21-22]。2010 年 WHO 推荐 Xpert MTB/RIF 技术用于肺结核的诊断,2013 年 WHO 又推荐 Xpert MTB/RIF 技术用于肺外结核的诊断^[23-24]。Meta 分析显示 Xpert MTB/RIF 诊断肺外结核的灵敏度为 77%~83%,特异度为 97%~98%^[25-26]。国内外研究表明,Xpert MTB/RIF 诊断骨关节结核的灵敏度为 63.57%~95.60,特异度为 96.20%~100.00%;检测骨关节结核利福平耐药的灵敏度为 93.33%~100.00%,特异度为 94.12%~100.00%^[17,27-30]。

Xpert MTB/RIF 技术的优点:自动化检测平台,操作简便,对实验室人员的水平要求较低;检测时间短,2 h 即可报告结果;准确率较高;全封闭系统,可降低交叉污染率,并可降低生物安全风险。缺点:仪器和试剂较昂贵;仅能检测利福平耐药。基因芯片技术、线性探针技术和 Xpert MTB/RIF 技术的特点见表 1。

不同标本类型及不同标本处理方法均会不同程度地影响检测的准确性,为尽可能减少误差,WHO 对不同标本的预处理方法做了推荐^[31],骨关节结核标本的预处理可参照淋巴结和其他组织的推荐处理步骤,使 Xpert MTB/RIF 技

表 1 各类项目在基因芯片、线性探针和 Xpert MTB/RIF 技术中的特点

项目	基因芯片技术	线性探针技术	Xpert MTB/RIF 技术
检测药物	利福平、异烟肼	利福平、异烟肼、乙胺丁醇、氟喹诺酮类、注射用二线药	利福平
核心技术	基因芯片技术	线性探针杂交技术	实时 PCR 技术
结果判读	自动	人工或自动	自动
配套仪器	专用	专用	专用
操作步骤	繁琐	繁琐	简便
检测时间(h)	6	6	2
覆盖位点	少数热点突变	少数热点突变	<i>rpoB</i> 81 bp 耐药决定区
缺点	PCR 结束后需开管操作,易污染	PCR 结束后需开管操作,易污染	对同时含有耐药和敏感菌株的标本无法判读

术应用于骨关节结核的诊断具有一定可行性。由于 Xpert MTB/RIF 在骨关节结核快速诊断中敏感度和特异度高,检测时间短,生物安全性好,并且可同时检测利福平耐药,适用于骨关节结核及其耐药性的快速诊断。

总之,骨关节结核若能早期诊断、早期治疗,不仅可控制病情进展,缩短治疗疗程,还可以减轻患者经济压力,减少或避免脊柱畸形。在骨关节结核的诊断中应在传统实验室诊断技术的基础上,辅以分子检测技术,相信随着检查方法的不断进步,骨关节结核的诊断将会更快速、更准确。

参 考 文 献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015.

[2] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161-2170.

[3] 骨关节结核临床诊断与治疗进展及其规范化专题研讨会学术委员会. 正确理解和认识骨与关节结核治疗的若干问题. *中国防痨杂志*, 2013, 35(5): 384-392.

[4] 秦世炳. 亟待重视与规范对骨关节结核的临床诊断及治疗. *中国防痨杂志*, 2016, 38(4): 248-249.

[5] Brodie D, Schluger NW. The diagnosis of tuberculosis. *Clin Chest Med*, 2005, 26(2): 247-271.

[6] Magnussen A, Dinneen A, Ramesh P. Osteoarticular tuberculosis: increasing incidence of a difficult clinical diagnosis. *Br J Gen Pract*, 2013, 63(612): 385-386.

[7] 吴国兰,陈晓红,翁丽珍,等. 基因芯片技术在鉴定分枝杆菌属及早期诊断耐药结核中的价值分析. *中国医刊*, 2016, 51(5): 44-47.

[8] Zhang Z, Li L, Luo F, et al. Rapid and accurate detection of RMP- and INH- resistant *Mycobacterium tuberculosis* in spinal tuberculosis specimens by CapitalBio™ DNA microarray: a prospective validation study. *BMC Infect Dis*, 2012, 12:303.

[9] 刘军兰,张诚,王红林. 应用基因芯片检测分枝杆菌在关节结核早期诊断中的临床应用. *中国临床研究*, 2013, 26(5): 498-499.

[10] 程鹏,张泽华,李力韬,等. 基因芯片法快速检测脊柱结核临床分离株 SM,EMB,LVFX,AMK,CPM 耐药. *第三军医大学学报*, 2014, 36(13): 1345-1349.

[11] 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.

[12] Skenders GK, Holtz TH, Riekstina V, et al. Implementation of the INNO-LiPA Rif. TB® line-probe assay in rapid detec-

tion of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(11): 1546-1552.

[13] World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). Geneva: World Health Organization, 2008.

[14] Brossier F, Guindo D, Pham A, et al. Performance of the new version (v2.0) of the GenoType MTBDRsl test for detection of resistance to second-line drugs in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(6): 1573-1580.

[15] Ritter C, Lucke K, Sirgel FA, et al. Evaluation of the AID TB resistance line probe assay for rapid detection of genetic alterations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(3): 940-946.

[16] Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis. *Eur Respir J*, 2008, 32(5): 1165-1174.

[17] Gu Y, Wang G, Dong W, et al. Xpert MTB/RIF and GenoType MTBDRplus assays for the rapid diagnosis of bone and joint tuberculosis. *Int J Infect Dis*, 2015, 36: 27-30.

[18] Molina-Moya B, Lacoma A, Prat C, et al. AID TB resistance line probe assay for rapid detection of resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *J Infect*, 2015, 70(4): 400-408.

[19] Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS, et al. A multi-site validation in India of the line probe assay for the rapid diagnosis of multi-drug resistant tuberculosis directly from sputum specimens. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88626.

[20] 董伟杰,秦世炳,赵立平,等. 骨关节结核各类标本进行结核分枝杆菌培养与 PCR 检测的阳性率结果分析. *中国防痨杂志*, 2014, 36(1): 46-48.

[21] 李禛,马远征,秦世炳. GeneXpert MTB/RIF 技术的应用进展及其在骨关节结核诊断中的价值. *中国防痨杂志*, 2016, 38(4): 322-326.

[22] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med*, 2010, 363(11): 1005-1015.

[23] World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva: World Health Organization, 2011.

[24] World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF system for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update. Geneva: World Health Organization, 2013.

- [25] Penz E, Boffa J, Roberts DJ, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert® MTB/RIF assay for extra-pulmonary tuberculosis; a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015, 19(3):278-284.
- [26] Maynard-Smith L, Larke N, Peters JA, et al. Diagnostic accuracy of the Xpert MTB/RIF assay for extrapulmonary and pulmonary tuberculosis when testing non-respiratory samples; a systematic review. *BMC Infect Dis*, 2014, 14:709.
- [27] Held M, Laubscher M, Zar HJ, et al. GeneXpert polymerase chain reaction for spinal tuberculosis; an accurate and rapid diagnostic test. *Bone Joint J*, 2014, 96-B(10):1366-1369.
- [28] 李力韬, 李洪敏, 马远征, 等. 应用 Xpert MTB/RIF 对脊柱结核临床标本行结核分枝杆菌与利福平耐药性检测的验证性研究. *中华骨科杂志*, 2014, 34(2):211-215.
- [29] 贾文韬, 李元. Xpert MTB/RIF 在骨关节结核患者快速诊断中的应用. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(3):259-263.
- [30] 唐恺, 董伟杰, 兰汀隆, 等. 应用 Xpert MTB/RIF 技术快速诊断膝关节结核. *中国防痨杂志*, 2016, 38(4):300-304.
- [31] World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual; technical and operational "how-to"; practical considerations. Geneva: World Health Organization, 2014.

(收稿日期:2016-04-10)

(本文编辑:郭萌)

· 文献速览 ·

强化抗结核药物治疗对成人结核性脑膜炎预后的影响

Heemskerk AD, Bang ND, Mai NT, et al. Intensified Antituberculosis Therapy in Adults with Tuberculous Meningitis. *N Engl J Med*, 2016, 374(2):124-134.

背景 结核性脑膜炎往往是致命的。尽管早期应用抗结核药物治疗及糖皮质激素辅助治疗可提高生存率,但仍有近 1/3 的患者死亡。本研究假设,强化抗结核药物治疗可以促进脑内结核分枝杆菌的杀灭,并降低患者的死亡率。

方法 该研究为随机、双盲、安慰剂对照的临床试验,研究对象为临床诊断为结核性脑膜炎的成年患者,包括部分并发人类免疫缺陷病毒(HIV)感染患者。研究共纳入患者 817 例(包括 349 例并发 HIV 感染患者),其中 409 例接受标准的治疗方案,408 例接受强化治疗方案。两组患者在人口学特征、HIV 感染、耐药情况、结核性脑膜炎诊断分类(明确、极为可能、可能、不太可能、其他情况)等方面差异无统计学意义,具有可比性。所有患者均被送至指定的 2 家越南医院,并接受标准口服抗结核药物治疗,包括:异烟肼($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每天最多 300 mg)、利福平($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、吡嗪酰胺($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每天最多 2000 mg)和乙胺丁醇($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每天最多 1200 mg),治疗 3 个月,随后改为利福平和异烟肼相同剂量口服 6 个月。既往接受抗结核药物治疗的患者在治疗前 3 个月加用链霉素($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每天最多 1000 mg)治疗。所有患者均在治疗的前 6~8 周接受地塞米松联合治疗。强化治疗以标准的 9 个月治疗方案为基础,在治疗前 2 个月增加利福平($15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)剂量并加用左氧氟沙星($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)联合治疗。对于耐异烟肼、利福平或者耐多药患者,治疗方案根据当地的策略及药物敏感性试验结果进行调整。HIV 感染患者根据越南的策略接受抗逆转录病毒治疗:入组前开始抗逆转录病毒治疗的患者延续原方案(若治疗方案中包含药

物奈韦拉平,需调整为依非韦伦);既往未接受治疗的患者,在抗结核药物治疗 2 个月开始抗逆转录病毒治疗。对于 CD4 细胞计数 $< 200 \text{ 个}/\mu\text{l}$ 的患者,给予复方新诺明($960 \text{ mg}/\text{d}$)进行预防性治疗。统计分析治疗 9 个月内的两组患者死亡情况(主要指标),及神经功能障碍情况(次要指标)。

结果 在 9 个月的随访中,标准治疗组 114 例及强化治疗组 113 例患者死亡[风险比(hazard ratio, HR):0.94; 95%CI:0.73~1.22; $P=0.66$]。在整体样本及各个亚组[包括:意向治疗数据集、符合方案数据集、意识障碍严重程度(英国)医学研究理事会(MRC)分级、HIV 感染、既往结核病病史、入组前是否接受抗结核药物治疗、耐异烟肼、耐利福平或耐多药、结核性脑膜炎诊断分类]中,两组死亡率并未显示差异有统计学意义。除了癫痫发作(标准治疗组 11 例,强化治疗组 23 例, $P=0.04$)、视力损伤(标准治疗组 4 例,强化治疗组 14 例, $P=0.02$),两组的神经功能障碍情况(小脑症状、单瘫、偏瘫、截瘫、四肢瘫、颅神经麻痹、格拉斯哥昏迷评分 ≤ 2)差异无统计学意义。导致治疗中断的不良事件总数两组间差异无统计学意义(标准治疗组 64 个,强化治疗组 95 个, $P=0.08$)。

结论 强化抗结核药物治疗方案较之标准药物治疗方案,并不具有较高的存活率。

上海市肺科医院 顾瑾 沙巍 编译

(收稿日期:2016-07-11)

(本文编辑:薛爱华)