

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.02.008

线性探针技术检测肺结核患者耐药情况临床评价*

侯婧, 韩 蓓, 张 艳, 孟 婧

(安徽省胸科医院, 安徽 合肥 230022)

摘要:目的 评价线性探针(HAIN)技术用于临床抗结核治疗的价值。方法 收集251例痰抗酸杆菌涂片阳性肺结核患者的痰标本,以罗氏培养及药敏试验为“金标准”,采用HAIN技术检测异烟肼及利福平的耐药情况。结果 HAIN技术对男性涂阳患者利福平($\chi^2=0.634, P=0.426$)和异烟肼($\chi^2=0.951, P=0.329$)的耐药检测,对女性涂阳患者利福平($\chi^2=0.174, P=0.676$)和异烟肼($\chi^2=2.791, P=0.095$)的耐药检测,以及全部涂阳患者利福平($\chi^2=0.806, P=0.369$)和异烟肼($\chi^2=0.012, P=0.914$)的耐药性检测效果与“金标准”比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。HAIN技术对利福平和异烟肼耐药检测的灵敏度分别为87.69%和57.73%,特异度分别为90.86%和87.24%。结论 HAIN技术能用于快速、准确地诊断利福平和异烟肼的耐药性,可作为辅助检测手段用于临床结核病尤其是耐药结核病的诊治。

关键词:线性探针;利福平;异烟肼;耐药性检测;实验诊断

中图分类号:R446;R521

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)02-0023-04

Clinical Evaluation on GenoType MTBDRplus(HAIN) Test in Detecting Drug Resistance of Pulmonary Tuberculosis Patients

HOU Jing, HAN Jun, ZHANG Yan, MENG Jing

(Anhui Chest Hospital, Hefei, Anhui, China 230022)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of the GenoType MTBDRplus(HAIN) test in clinical anti-tuberculosis treatment.

Methods The sputum samples of 251 patients with pulmonary tuberculosis with positive acid-fast bacilli sputum smear were collected.

*基金项目:2015年安徽省卫生和计划生育委员会科研计划项目[15tb001]。

第一作者:侯婧,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为老年结核病,(电子信箱)hj139ahsxkyy@sina.com。

血性心肌细胞^[9-10]。

血液流变学主要是针对血液黏滞性、凝固性的研究,是评估患者疾病发展程度的重要参数,该指标如果发生异常会加重细胞组织缺氧缺血,导致红细胞膜功能障碍进一步加重,从而损伤组织细胞。心肌细胞缺血缺氧可抑制NO释放,同时使冠状动脉进一步痉挛,加重心肌受损。因此,NO含量可一定程度反映心肌受损程度。MDA是大量的氧自由基造成脂质过氧化损伤的产物,可抑制前列腺素合成酶活性,使血管收缩,加重心肌损伤。血清中FFA的含量与脂代谢、糖代谢、内分泌功能有关,心肌缺血使FFA含量异常增加,会进一步加重其缺血程度。本研究结果表明,三七总皂苷可显著减少心肌缺血模型大鼠血清中MDA,FFA,NO含量,显著降低血小板黏附率和红细胞比容水平,减少血液中纤维蛋白原的含量。但本研究由于样本量较少,且仅限于血清生化学和血液流变学指标,结果可能存在一定片面性,后期还需增大样本量,同时在基因和蛋白水平层面进行深入研究,为三七总皂苷的临床应用提供更有力的依据。

综上所述,三七总皂苷对心肌缺血模型大鼠的血清生化学和血液流变学指标有一定改善作用,其机制可能与抗氧化和改善血液质量有关。

参考文献:

- [1] 何 滨,李秋波,许 丹,等. 佰塞通注射液治疗老年冠心病心肌缺血的疗效及对血液流变学的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014,34(12):3459-3460.
- [2] 李 光,邢小燕,张美双,等. 中药三七对缺血再灌注损伤的保护作用及应用前景[J]. 中国药理学通报,2015,31(10):1340-1344.
- [3] 廖正根,韩锡镇,李 翔,等. 三七总皂苷复合纳米囊泡的理化性质及对大鼠心肌缺血的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2013,48(11):899-903.
- [4] 秦旭航,孙敬蒙,郑 菲,等. 三七总皂苷类脂质体抗急性心肌缺血药效学研究[J]. 人参研究,2017,29(1):21-24.
- [5] 张 毅,戴胜云,徐 冰,等. 三七总皂苷抗心肌缺血再灌注损伤的药理研究进展[J]. 江苏中医药,2017,49(1):82-85.
- [6] 陆仕华,巫丽丽,刘华刚,等. 三七总皂苷肠溶微丸对高脂血症家兔血液流变学的影响[J]. 中国药师,2017,20(4):658-660.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:11.
- [8] 姬艳芬,冯利民. 三七总皂苷对心肌缺血大鼠血清IL-6和Ang II的影响[J]. 江苏中医药,2014,46(4):72-73.
- [9] 李青融,王子好. 三七总皂苷药理作用的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2017,33(9):216-218.
- [10] 姜 丽,宁 可,包怡敏. 三七总皂苷抗缺血再灌注损伤机制研究进展[J]. 中华中医药学刊,2016,34(2):267-270.

(收稿日期:2018-07-11)

The resistance of isoniazid and rifampicin was detected by HAIN test with Lowenstein-Jensen (L-J) cultivation and drug sensitive test as the gold standard. **Results** Compared with the gold standard, there was no significant difference in the effect of HAIN in detecting the resistance of rifampicin ($\chi^2 = 0.634$, $P = 0.426$) and isoniazid ($\chi^2 = 0.951$, $P = 0.329$) in male patients with smear-positive, in detecting the resistance of rifampicin ($\chi^2 = 0.174$, $P = 0.676$) and isoniazid ($\chi^2 = 2.791$, $P = 0.095$) in female patients with smear-positive, and in detecting the resistance of rifampicin ($\chi^2 = 0.806$, $P = 0.369$) and isoniazid ($\chi^2 = 0.012$, $P = 0.914$) in all patients with smear-positive ($P > 0.05$). The sensitivity and specificity of HAIN for the resistance test of rifampicin and isoniazid were 87.69%, 57.73% and 90.86% and 87.24%, respectively. **Conclusion** HAIN test can quickly and accurately diagnose the resistance of rifampicin and isoniazid, and can be used as an auxiliary test method in the diagnosis and treatment of clinical tuberculosis, especially drug-resistant tuberculosis.

Key words: GenoType MTBDRplus (HAIN); rifampicin; isoniazid; drug resistance test; laboratory diagnosis

耐药肺结核患者的治疗周期长、治疗成本高、治愈率低,该病患者的增多^[1],进一步增大了传播概率,也加重了社会的经济负担。然而,传统的罗氏培养法培养结核分枝杆菌需要8周^[2],进一步进行药物敏感性试验(简称药敏试验)诊断约需3个月,无法满足及时诊断和早期合理用药的需要^[3]。线性探针(HAIN)技术通过对耐药相关基因的PCR扩增和反向杂交,对利福平的耐药基因 rpoB 和异烟肼的耐药基因 KatG 及 inhA 进行检测,从而可判断结核分枝杆菌对利福平、异烟肼的耐药性,并能在24 h内上报结果,已被世界卫生组织(WHO)推荐为一线抗结核药药敏试验的“金标准”^[4]。本研究中以结核分枝杆菌的罗氏培养和绝对浓度药敏法为“金标准”,对HAIN技术检测利福平和异烟肼耐药性的效果进行评价,从而评估HAIN技术用于抗结核治疗的临床价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取我院2016年1月至6月痰抗酸杆菌涂片阳性的住院患者251例,年龄15~85岁,平均(47.67±18.33)岁;男187例(74.50%),平均年龄(50.17±17.32)岁;女64例(25.50%),平均年龄(40.39±19.40)岁。

1.2 试剂及仪器

罗氏培养与药敏试验使用珠海贝索生物技术有限公司固体罗氏培养基,结核分枝杆菌抗原采用杭州创新生物检控技术有限公司试剂盒检测,并应用Haier公司HR50-IIA2生物安全柜试验。扩增及杂交选用德国Hain Life Sciences公司的GeneType MTBDR-Plus 1.0 Kit试剂盒。DNA杂交仪选用梅里埃公司的GT-Blot 48全自动微生物检测系统。严格按照试剂盒及相关仪器配套说明书进行操作。

1.3 方法

患者晨起立即用清水漱口,采集其漱口后深咳出的脓样、干酪样或脓性黏液样性质的痰液标本2份,一份采

用罗氏培养及药敏试验检测,一份应用HAIN技术检测。

传统罗氏培养及药敏试验:痰标本经2倍于标本量的消化液(4%氢氧化钠)进行前处理,然后接种到酸性罗氏培养基培养。用接种环取一环培养基上的菌落,研磨后与标准麦氏管比对,制成质量浓度为1 g/L的菌悬液,梯度稀释为 10^{-2} g/L和 10^{-4} g/L,分别接种含异烟肼(0.1 μg/mL)和利福平(0.2 μg/mL)的药敏试验培养基,放入细菌培养箱中,37℃培养6~8周,观察结果。

HAIN技术检测:利用超声波水浴破坏细菌,提取DNA;应用热启动Taq酶扩增目的DNA片段;将PCR扩增产物与试纸条上固定的探针进行杂交显色;利用酶显色反应对结果进行判读。以罗氏培养和药敏试验作为“金标准”,检测HAIN技术下药物的耐药程度、敏感程度分别计算其敏感度、特异度。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件分析,耐药率比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表1至表2。以罗氏法为标准,HAIN技术对利福平及异烟肼耐药检测的灵敏度分别为87.69%和52.73%,特异度分别为90.86%和87.24%。

表1 HAIN法与罗氏法耐药性检测结果比较[例(%)]

检测方法	利福平耐药			异烟肼耐药		
	男性	女性	合计	男性	女性	合计
HAIN法	58(31.02)	16(25.00)	74(29.48)	40(21.39)	14(21.88)	54(21.51)
罗氏法	51(27.27)	14(21.88)	65(25.90)	48(25.67)	7(10.94)	55(21.91)
χ^2 值	0.634	0.174	0.806	0.951	2.791	0.012
P值	0.426	0.676	0.369	0.329	0.095	0.914

表2 HAIN法与罗氏法药敏试验结果比较(例, n=251)

HAIN法	利福平(罗氏法)		异烟肼(罗氏法)	
	耐药	敏感	耐药	敏感
耐药	57	17	29	25
敏感	8	169	26	171
合计	65	186	55	196

3 讨论

耐多药(同时对利福平和异烟肼耐药)结核病具有诊断难、治疗难、传播风险大的特点,是我国当前结核病控制的重点和难点。早期诊断可尽早控制耐药结核病的传播,同时能及时给予合理、有效的抗结核治疗。传统的罗氏培养法检测结核分枝杆菌的药物敏感性耗时长、工作量大,且在耐药性检测期间,只能根据经验应用抗结核药物,可能导致实施不合理的抗结核治疗方案。显然,寻找快速检测结核分枝杆菌耐药性的方法已成为耐药结核病控制的关键环节^[5]。基因型方法在检测速度、操作标准化、潜在高通量及较低的生物安全条件等方面具有较大优势,更适于大规模检测耐药结核^[6]。HAIN技术能通过进行反向探针杂交技术快速检测样本中的结核分枝杆菌复合群(MTBC),并通过同时检测 *rpoB*, *katG*, *inhA* 3种基因,可在较短时间内检测利福平和异烟肼的耐药性,近几年已在全世界广泛应用^[7-9],该检测整个周期仅为 24 h,能快速得到耐药性结果,确保更多结核病患者能得到快速、准确的诊断和治疗^[10]。

本研究中采用 HAIN 技术对不同性别及全部痰抗酸杆菌涂片阳性肺结核患者利福平、异烟肼的耐药性进行检测并与罗氏培养及药敏试验“金标准”进行比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),说明 2 种检测方法具有较好的一致性。但本研究中 HAIN 技术检测利福平、异烟肼耐药的敏感度及特异度均低于屈亚虹等^[11]、李强等^[12]报道的结果。究其原因,一方面,本研究中采用的是痰标本直接检测,而其他研究多采用实验室分离菌株进行检测;另一方面,本研究中纳入样本数量较少,结果可能存在一定的选择偏倚;此外,分子生物学技术对标本质量的要求较高,样本中结核分枝杆菌数目较少或样本中存在抑制 DNA 扩增的物质等,均可能影响检测结果^[13]。

本研究中,少数患者利福平耐药检测结果与文献报道不一致,考虑原因为存在 *rpoB* 以外的基因突变^[14],呈假阴性;另外,部分结核菌株的 *rpoB* 基因突变位点为沉默或无效基因,此类基因不表达或低表达^[15],呈假阳性。

本研究中,HAIN 技术对异烟肼耐药性检测的灵敏度及特异度均明显低于利福平。考虑可能是由于结核菌对利福平耐药仅由 *rpoB* 单基因突变引起,而 *katG*, *inhA*, *ahpC* 等多个基因突变均可导致异烟肼的耐药,HAIN 技术仅检测 *katG* 和 *inhA* 2 个基因判断异烟肼的

可导致自身基因表达增强,进而补偿 *KatG* 基因突变所导致的过氧化氢-过氧化物酶的缺乏,异烟肼活化不受影响,表型为敏感^[16]。HAIN 技术检测的利福平耐药率高于罗氏培养法,可能由于 HAIN 技术结果由肉眼直接读出,会造成主观偏倚^[12],同时操作过程中可能造成污染导致假阳性^[17]。两种检测方法所得耐药率均高于国内全国结核病耐药性基线调查结果(8.32%)^[18],考虑可能是由于我院为安徽省的结核病诊疗中心,收住的复治及重症肺结核患者较多,故耐药率较高。

综上所述,HAIN 技术诊断的准确性、敏感度和特异度均较高,且能用于快速判断利福平、异烟肼的耐药性,可为早期发现耐多药肺结核提供诊断依据,具有较大的临床意义。临床工作中在等待罗氏培养结果期间,可以 HAIN 技术作为辅助检测手段,从而让患者尽早得到合理、有效的抗结核治疗。

参考文献:

- [1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012,34(8):485-508.
- [2] WS288-2017,肺结核诊断标准[S].
- [3] 王小平,陆峰. 应用线性探针技术(HAIN)对临床结核菌分离株进行快速耐药性分析[J]. 江苏预防医学,2016,27(3):265-267.
- [4] LENG XF, CHEN MW, XIAN L, et al. Combined analysis of mR-NA expression of ERCC1, BAG-1, BRCA1, RRM1 and TUBB3 to predict prognosis in patients with non-small cell lung cancer who received adjuvant chemotherapy[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012,31:25.
- [5] 管记涌,王嫩寒,易俊莉. MTBDR plus 方法快速检测北京地区临床结核分枝杆菌分离株利福平和异烟肼耐药性效果评价[J]. 中国防痨杂志,2010,32(10):611-614.
- [6] 范齐文,郭建,张慧涨. M/XDR-TB 的快速分子检测和耐药特征分析[J]. 中华微生物和免疫学杂志,2011,31(12):1133-1137.
- [7] LACOMA 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]. J Clin Microbiol, 2008,46(11):3660-3667.
- [8] BANG D, BENGARD ANDERSEN A, THOMSEN VO. Rapid genotypic detection of rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis directly in clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2006,44(7):2605-2608.
- [9] 陆琛,马远征. 分子线性探针测定法在结核病诊断中的研究进展[J]. 中国防痨杂志,2016,38(3):218-221.
- [10] ZUMLA A, GEORGE A, SHARMA V, et al. The WHO 2014 global tuberculosis report - further to go[J]. Lancet Glob Health, 2015,3(1):10-12.
- [11] 屈亚虹,李卫彬,振亚,等. MTBDR plus 线性探针技术快

本栏自由

重庆赢英康医疗器械有限公司

协办

耐药性,对 *ahpC* 等其他可能导致耐药的基因未进行检测。有研究表明, *ahpC* 突