

免疫层析法试剂盒快速鉴别结核与非结核 分枝杆菌临床菌株的应用价值

韩敏 乐军

(同济大学医学院附属上海市肺科医院 上海 200433)

摘要:目的 评估免疫层析法试剂盒快速鉴别结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌临床菌株的试剂盒应用价值。方法 用免疫层析法试剂盒检测 240 株分枝杆菌菌株和 50 株其他微生物菌株,包括 38 株细菌、12 株真菌、65 株 N TM,175 株结核分枝杆菌临床菌株。结果 结核分枝杆菌株检测阳性为 173 株,灵敏度为 98.9%;115 株其他微生物菌株检测结果均为阴性,特异性 100%。结论 免疫层析法试剂盒能快速、准确鉴别结核与非结核分枝杆菌临床菌株,无需其他设备。

关键词:分枝杆菌;结核;分枝杆菌属;抗原;细菌;细菌蛋白质类;试剂盒;诊断

通讯作者:乐军(yuejunnan@yahoo.com.cn)

Evaluation of an Immunochromatographic Assay Kit for Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Isolates

Han Min, Yue Jun

Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University School of Medicine,
Shanghai 200433, China

Abstract: **Objective** To evaluate a new immunochromatographic assay (ICA) for rapid discrimination between *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculosis mycobacteria (N TM) in clinical isolates. **Method** 290 clinical isolates including 175 *Mycobacterium tuberculosis*, 65 N TM, 38 bacteria, 12 fungal isolates were detected using an ICA kit. **Results** The sensitivity and specificity of the kit were 98.9% (173/175) and 100% (115/115). **Conclusions** The ICA can detect rapidly and effectively *Mycobacterium tuberculosis* in clinical isolates.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium*; Antigen, bacterial; Bacterial Proteins; reagent kits, diagnostic

Correspondence to: Yue Jun(yuejunnan@yahoo.com.cn)

尽管抗结核药物应用已有半个多世纪,但结核病仍居传染病致死因素的首位。我国结核病防治工作任重道远,快速诊断结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)能够使结核病早发现,早治疗,减少疾病的传播。随着 HIV 感染者人数的不断增加,播散性非结核分枝杆菌(nontuberculous mycobacterium, N TM)感染以及以往认为非致病的分枝杆菌也可引起人类疾病的报道也随之增加。我院 1998—2004 年分枝杆菌属阳性培养中, N TM 培养

阳性率已升至 3.0%^[1], N TM 感染与结核分枝杆菌感染在临床表现、全身中毒症状和局部损害都是相似的;许多 N TM 对抗结核药物具有天然耐药性,不同的 N TM 菌种对抗结核药物敏感性也是不同的,因此,治疗方案也因菌种而异^[2]。传统的实验室诊断 MTB 方法主要是抗酸染色和培养。然而,抗酸染色的敏感性较低,不能鉴别 MTB 与 N TM;培养敏感性和特异性较前者好,但检测出阳性标本需要数周的时间。因此,快速鉴别 MTB 与 N TM,对于指导结核

病的临床治疗,控制结核病的传播是非常必要的。

MTB 的生物化学、免疫学与分子生物学特征表明,MTB 抗原的鉴定对于区分 MTB 与 NTM 的诊断技术的发展是有帮助的。已知的 MTB 分泌蛋白有 33 种之多。其中一种重要的蛋白——MPT64,仅存在于结核分枝杆菌、亚洲分枝杆菌、牛分枝杆菌及牛分枝杆菌 BCG 亚种,是结核分枝杆菌复合群高度特异性蛋白,可用来鉴别结核分枝杆菌复合群和 NTM^[3]。SD TB 抗原 MPT64 快速检测试剂盒(SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid)采用免疫层析技术(immunochromatographic assay, ICA),可以简单、快速地鉴别培养阳性的结核分枝杆菌。检测时间仅需 15 min。本文主要评估该方法检测临床菌株的应用价值。

1 资料和方法

1.1 标本的收集 选取上海市肺科医院液、固体分枝杆菌培养阳性临床菌株 240 株,包含 195 株 BD MGIT 960 培养阳性菌株和 45 株 LJ 培养基培养阳性菌株,且培养阳性临床菌株中没有一个同时存在结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的。选择 38 株细菌菌株和 12 株真菌菌株用于特异性的检测(细菌和真菌菌株菌种见表 1)。1 株结核分枝杆菌标准菌株 H₃₇Rv,用于检测细菌数量对于检测的影响。所有的临床菌株储存于 - 70 低温冰箱备用。

表 1 细菌、真菌菌株菌种

菌 种	菌株数
细菌	38
鲍氏不动杆菌	3
大肠埃希杆菌	3
阴沟肠杆菌	4
肠球菌	2
肺炎克雷伯杆菌	3
淋病奈瑟菌	3
绿脓假单胞菌	3
沙门氏菌 D 群	2
金黄色葡萄球菌	3
表皮葡萄球菌	2
溶血性葡萄球菌	2
肺炎链球菌	3
化脓性链球菌	2
草绿色链球菌	3
真菌	12
白色念珠菌	3
光滑念珠菌	3
热带念珠菌	3
新型隐球菌	3

分枝杆菌培养物经抗酸染色、分枝杆菌菌群鉴定试验和 DNA 测序鉴定。分枝杆菌菌种初步鉴定试验是通过含对硝基苯甲酸(PNB)鉴别培养基来鉴别。分枝杆菌菌株分类见表 2。

表 2 分枝杆菌菌株分类

菌株名称	菌株数
结核分枝杆菌复合群	175
NTM	65
胞内分枝杆菌	20
鸟分枝杆菌	15
戈登分枝杆菌	2
堪萨斯分枝杆菌	11
偶然分枝杆菌	4
龟分枝杆菌龟亚种和脓肿亚种	13
共 计	240

1.2 方法原理 试剂盒由样本垫,胶体金垫,硝酸纤维素膜和吸收垫组成。鼠的单克隆抗 MPT64 抗体作为捕获物,固定于硝酸纤维素膜上,加样显色作为对照条带;而识别 MPT64 其他表位的抗体与胶体金部分结合,用于抗原捕获物,加样显色作为检测条带。当加样孔中加入样本时,对照条带显色;但样本中含有 MPT64 抗原时,抗原与胶体金结合的 MPT64 抗体结合后显色。通过条带的显色来判断培养阳性的菌株为 MTB 还是 NTM。

1.3 操作方法 液体培养物直接加样 100 μl 于加样孔内;固体培养物取 3~4 个菌落加入到 200 μl 缓冲液中制备成菌悬液备用,取出 100 μl 加入加样孔内。

1.4 结果的判读 试剂盒显示窗左边的条带为对照条带,当加样后对照条带显紫色说明该试剂盒是有效的,否则结果判读为无效。右边的条带是检测条带。

加样后 15 min 观察结果,结果分析:(1)当仅有对照条带显色时,结果为阴性;(2)当对照条带和检测条带均显色时,结果为阳性。

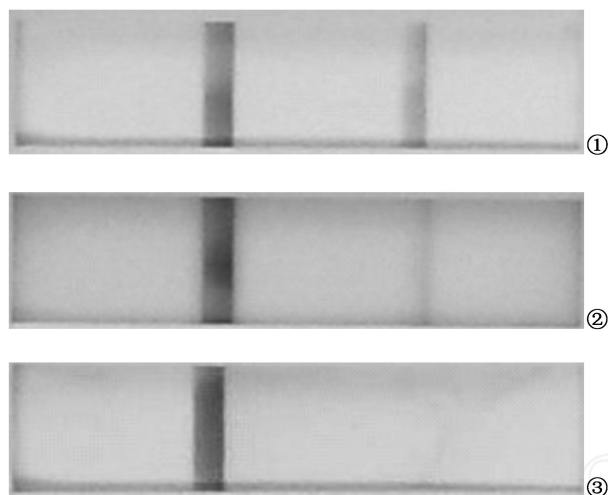
图 1 为样本检测结果显示图。

2 结果

290 株临床菌株检测均出现对照条带,所有结果均为有效结果。

2.1 细菌和真菌的检测结果 38 株细菌菌株和 12 株真菌菌株检测均为阴性。

2.2 分枝杆菌菌株检测结果 培养阳性结核分枝杆菌 175 株,其中 BD MGIT 960 培养阳性菌株 145 株和 LJ 培养阳性菌株 30 株。检测结果显示:2 株 LJ 培养阳性菌株检测结果为阴性,145 株 BD MGIT 960 培养阳性结核分枝杆菌菌株和 28 株 LJ 培养阳性结核分枝杆菌菌株为阳性。65 株 NTM



结核分枝杆菌检测为阳性结果;
为 H₃₇Rv 混悬液 1 : 100 稀释后检测弱阳性结果;
为 NTM 龟分枝杆菌阴性结果

图 1 MPT64 抗原检测试剂盒鉴定 MTB 与 NTM 显示图

均为阴性。

2.3 特异性与敏感性结果 NTM、细菌和真菌的菌株检测结果为阴性,特异性为 100 % (115/115); 175 株结核分枝杆菌中有 173 株检测为阳性,敏感性为 98.9 % (173/175)。

2.4 试剂盒对细菌数量检测分析 结核分枝杆菌标准菌株 H₃₇Rv 制备成浊度为 1.0 McFarland 混悬液,将混悬液按比例稀释分析细菌数量对结果检测的影响。当菌液 1 : 100 稀释后(细菌数量相当于 7.0×10^5 CFU/ml),试剂盒条带颜色变淡,继续稀释至 1 : 1 000 时(细菌数量相当于 7.0×10^4 CFU/ml),条带颜色消失,反应为阴性。

3 讨论

MPT 64 (Rv1980c; GenBank accession no. NC_000962.2) 是一种 24 kDa 的结核分枝杆菌分泌蛋白,编码基因含有 228 个氨基酸,位于 RD2 区。MPT64 是早期培养滤液中主要的分泌蛋白,具有较强的细胞免疫活性,可诱导迟发型超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH),并能诱导 T 淋巴细胞产生 IFN- γ ,是 MTB 高度特异性的抗原蛋白。天然及重组的 MPT64 都能够使结核病人产生皮肤 DHT 和 T 细胞反应。MPT 64 是 MTB PCR 方法最特异和最敏感的 DNA 序列。通过扩增 MPT 64 基因的 PCR 方法可以提高结核病的诊断敏感性^[4]。

我们试验的目的是评估 SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid 方法快速鉴别 MTB 和 NTM 的临床应用价值。与传统的菌群鉴定方法相比,结果获得仅需

要 15 min,可提前 7 ~ 12 d,敏感性 98.9 %、特异性 100 %,操作简便,无需昂贵的实验设备。可以减少不必要的抗结核药物治疗。标本中有 2 株 MTB LJ 培养阳性结核菌株为阴性,将菌株重新转种获取新鲜培养物,检测结果为阳性,考虑假阴性结果是由于菌株生长时间过长,菌株活性下降,不能分泌有效的 MPT64 所造成。还应当注意一点,由于 MPT64 存在基因突变的可能,在 MPT64 基因突变高发地区还应考虑到是基因突变引起阴性结果的可能^[5]。

尽管结核分枝杆菌是分枝杆菌疾病中主要致病因素,但是近些年 NTM 发病不断增加,也引起临床对于 NTM 诊断的高度重视,早期快速鉴别诊断 MTB 和 NTM,缩短病人的诊断时间,对于临床有效治疗尤为重要。快速诊断还可以有效控制疾病传播,减少不必要的医疗资源浪费,对社会和人群都具有不可忽略的贡献。传统的生化方法鉴定需要数周的时间,有时结果还会不明确;先进的核酸扩增技术在结核病早期诊断中有较高的敏感性与特异性,但需要昂贵的实验室设备与仪器,高成本也降低了该技术的应用,还不能区分活的分枝杆菌与死的分枝杆菌。我们研究表明,免疫层析原理的 SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid 方法与传统的培养鉴定方法相比,具有高度灵敏性和高度特异性优势,尤其在液体培养物鉴定方面更具有优势。该方法无需额外的实验室设备,检测时间仅需 15 min,基层单位也适合使用,应用前景广阔,是一种快速鉴定结核分枝杆菌的方法。

4 参考文献

- [1] 梁莉,张滢蓉,乐军,景玲杰,高荣梁,肖和平.上海市非结核分枝杆菌感染趋势及耐药分析[J].中华医院感染学杂志,2007,17(7):895-897.
- [2] Wagner D, Young LS. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review[J]. Infection,2004,32(5):257-270.
- [3] Mustafa T, Wiker HG, Mfinanga SG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemistry using a Mycobacterium tuberculosis complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis[J]. Mod Pathol,2006,19(12):1606-1614.
- [4] Bhanu NV, Singh UB, Chakraborty M, Suresh N, Arora J, Rana T, Takkar D, Seth P. Improved diagnostic value of PCR in the diagnosis of female genital tuberculosis leading to infertility[J]. J Med Microbiol,2005,54:927-931.
- [5] Hirano K, Aono A, Takahashi M, Abe C. Mutation including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative Mycobacterium tuberculosis isolate[J]. J Clin Microbiol,2004,42(1):390-392.

(收稿日期:2009-7-12)

(本文编辑:张晓进)