

· 病例报告 ·

IS6110 基因缺失结核分枝杆菌感染的肺结核一例

谈小文 王媛 崔晓利 党丽云 雷静 任斐 赵国连

分子生物学检测方法因其具有检测敏感度高、特异性强和时效性高等特点,成为结核病快速诊断的重要检测手段。对于分子生物学检测,寻找检测效率高且存在特异性的靶基因尤为重要,分子检测靶基因的种属特异性和多拷贝序列是确保检测结果准确性和高效性的重要因素。结核病分子生物学病原诊断常用的诊断靶标有 *IS6110*、*16S rRNA*、*gyrB* 和 *rpoB* 基因等,以上基因均属于管家基因。其中 *IS6110* 为多拷贝基因,其用于病原学诊断敏感度高于单拷贝基因,但是 *IS6110* 基因并非存在于所有结核分枝杆菌中,有的菌株 *IS6110* 基因缺失,可能造成假阴性结果^[1]。本研究对西安市胸科医院收治的 1 例 *IS6110* 基因零拷贝菌株感染的结核病患者病原学诊断过程及分离株测序结果进行分析,旨在为临床诊断工作提供借鉴。

临床资料

患者,男,50 岁。因间断咳嗽、咳痰、胸闷、气促 10 个月,伴发热 1 周,于 2020 年 6 月 13 日入住西安市胸科医院。患者 5 年前无明显诱因出现咳嗽、咳白色黏痰,未行特殊处理。2019 年 8 月 27 日患者因胸闷、气促,就诊于当地医院,诊断为“尘肺”,给予对症治疗后症状稍有好转,但活动后仍感到气促,休息后可缓解,随着病程进展,气促症状逐渐加重。患者于 2020 年 6 月 5 日出现发热,最高体温 37.9°,午后明显,无畏寒、寒颤,就诊于山阳县中医医院,行胸部 CT 示双肺出现病灶并形成空洞,不排除肺结核可能,遂来我院做进一步诊断治疗。患病期间,患者无咯血,无胸痛和心慌,无恶心和呕吐,体质量 6 个月减轻 10 kg。

入院时体格检查:体温 37 °C,脉搏 92 次/min,呼吸频率

24 次/min,血压 140/100 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。患者神志清楚,呼吸平稳,口齿清晰,全身皮肤黏膜无黄染,全身浅表淋巴结无肿大;胸廓正常,无肋间隙增宽;双肺叩诊清音,呼吸音粗,闻及干性啰音;心率 92 次/min,节律齐,无杂音;腹部柔软,无压痛、反跳痛;肝脾肋下未扪及;四肢活动正常,双下肢未见浮肿。

实验室检查:白细胞(WBC) $5.53 \times 10^9/L$ [正常范围: $(3.50 \sim 9.50) \times 10^9/L$], 血红蛋白(Hb) 8 g/L(正常范围: 130~175 g/L), 血红细胞沉降率(ESR) 25 mm/1 h(正常范围: 0~15 mm/1 h), C 反应蛋白(CRP) 130.94 mg/L(正常范围: 0~6.00 mg/L); 抗链球菌溶素 O(ASO)、类风湿因子(RF)、免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA)均阴性,结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT.TB)阳性;降钙素原 1.05 $\mu\text{g/L}$ (正常范围: 0~0.50 $\mu\text{g/L}$); 结核抗体五项: 38 kDa 抗体阳性, 培养滤液蛋白 10(CFP-10) 抗体阳性, 其余为阴性。痰标本涂片分枝杆菌抗酸染色阳性(++++)。痰标本分枝杆菌复合群核酸检测(双通道 PCR-荧光探针法) 结果为非结核分枝杆菌核酸阳性。结核分枝杆菌核酸检测(RNA 恒温扩增) 结果为结核分枝杆菌阳性。为进一步验证双通道 PCR-荧光探针法的假阴性及 RNA 恒温扩增检测假阳性的可能, 用同一份标本进行结核分枝杆菌核酸检测(恒温扩增荧光法), 结果为阴性; GeneXpert MTB/RIF 检测(巢式探针-荧光定量 PCR 法) 结核分枝杆菌阳性, 利福平野生型。同时对患者入院标本进行分枝杆菌 BACTEC MGIT 960 液体培养, 1 周后痰培养分枝杆菌阳性, MPB 64 单克隆抗体检测阳性。痰标本直接提取的核酸样本及培养后细菌提取的核酸样本同时做分枝杆菌菌种基因鉴定(DNA 微阵列芯片法) 结果均为结核分枝杆菌。为进一步明确分子生物学检测结果不一致的原因, 通过痰标本直接提取核酸及培养后细菌提取核酸进行 *IS6110* 基因测序, 测序结果显示, 该例患者感染的结核分枝杆菌为 *IS6110* 基因零拷贝菌株。对培养后的菌株进行结核分枝杆菌药物敏感性(微孔板法) 试验显示除异烟肼和帕司烟肼耐药外, 其余药品均敏感。

影像学检查: 患者入院前查胸部 CT(山阳县中医医院, 2020-06-11): 胸廓对称无畸形, 双侧肺野透光度降低, 支气



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口, 提供丰富的线上扩展功能, 包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2021.03.020

基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2018SF-254)

作者单位: 710100 西安市胸科医院检验科

通信作者: 赵国连, Email: 774567495@qq.com

管血管束增重、紊乱,双肺弥漫性粟粒状、斑片状及条索状密度稍高影,双肺上叶后段可见较大不规则厚壁空洞,边缘毛糙,壁内凹凸不平,不光整,心影形态大小未见异常。入院后在我院查胸部 CT(2020-07-06):双肺多叶多段有散在分布微小结节密度增高影并空洞形成;尘肺;双侧胸腔积液及胸膜增厚粘连(图 1~4)。

治疗情况:患者住院初期分子诊断已明确为结核分枝杆菌感染,而培养结果未出,无法进行药物敏感性检测,且患者病情复杂,病灶较重,遂给予左氧氟沙星加强抗结核治疗,联合 H-R-Z-E(H:异烟肼;R:利福平;Z:吡嗪酰胺;E:乙胺丁醇)方案行抗结核治疗,并常规辅以预防性保肝治疗。入院 15 d 后分枝杆菌培养阳性,微孔板药物敏感性检测结果提示患者对异烟肼和帕司烟肼耐药,胸部 CT 检查(2020-07-06)结果显示治疗效果不理想。经过评估,对该例患者治疗方案进行修正,继续给予左氧氟沙星加强抗结核治疗,联合 R-Z-E-Am(Am:阿米卡星)方案行抗结核治疗,并转至耐药科继续治疗,患者诉因家庭原因坚持出院,于 2020 年 7 月 8 日办理出院。

讨 论

结核分枝杆菌复合群是引起肺结核的主要病原体,IS6110 是结核分枝杆菌基因组中的一段多拷贝保守序列,含有 1361 bp 核苷酸和 28 bp 的反向末端的重复序列,只存在于结核分枝杆菌复合群中^[2]。对于我国广泛流行的北京基因型结核分枝杆菌^[3],根据菌株基因组核转录因子(nuclear transcription factors, NTF)区域中是否存在结核分枝杆菌特异性插入序列(insertion sequence, IS)6110,可分为北京基因型古代株和北京基因型现代株 2 个亚型^[4]。北京基因型古代株的 NTF 区中没有 IS6110,而北京基因型现代株 NTF 区中至少含有 1 个 IS6110。

近年来,基于针对结核分枝杆菌特定序列的 IS6110、hsp65、16S rRNA、*rpoB* RRDR 区域、85B 抗原、38 kDa 抗原的某些序列的聚合酶链反应(PCR)扩增,已经开发了许多结核病分子诊断方法。虽然大多数结核分枝杆菌分离株中 IS6110 基因为高拷贝基因,但谢彤等^[5]报道天津地区 517 例临床分离株中 70 株为 IS6110 基因缺陷株,其检出率高达 13.5%,所以临床应用中要警惕单拷贝或零拷贝分离株对以

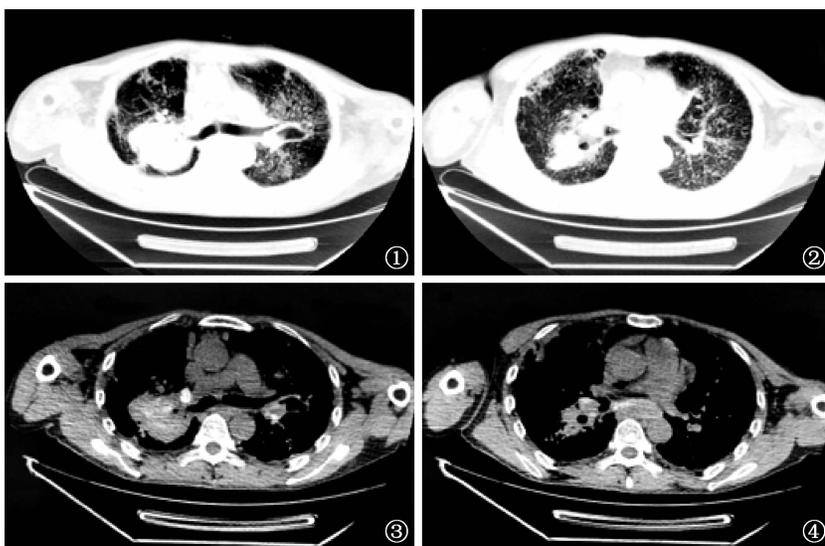


图 1~4 患者,男,50 岁。胸部 CT 扫描(2020-07-06)显示,双肺弥漫分布粟粒状、斑片状及条索样密度增高影,边界欠清晰,密度不均匀,双肺上叶近肺门处病灶实变,以右肺为著,局部伴空洞形成,右肺上叶部分支气管变窄;双肺门可见增大的淋巴结,伴钙化;双侧胸膜增厚、粘连

IS6110 为靶点的分子检测可能造成假阴性结果的可能。IS6110 在结核分枝杆菌检测中具有特异性、稳定性及高拷贝性,相比于单拷贝的其他序列如 MPB64、MTP40 等具有更高的敏感度和特异度,因此 IS6110 是目前临床分子生物学结核分枝杆菌诊断最常用的扩增靶点^[6]。

但是 IS6110 低拷贝甚至零拷贝的结核分枝杆菌将会对以 IS6110 为检测靶点的检测方法的阳性率及准确性造成一定影响。我国已有文献报道 IS6110 缺失菌株(北京基因古代株)在中国不同地区的流行率为 13.5%~23.57%^[5,7]。裴秀英等^[8]对 16 株分离自上海的结核分枝杆菌菌株应用 RFLP 技术进行研究,发现 1 株 IS6110 零拷贝株和 1 株 IS6110 单拷贝株。然而,目前对于中国大部分地区 IS6110 拷贝数分布的研究还不足,低拷贝或零拷贝菌株对临床诊断的影响还需要进一步探究。

本例患者入院初期应用以 IS6110 和 *hsp65* 为靶基因的结核分枝杆菌复合群核酸检测方法(双通道 PCR-荧光探针法),结果为非结核分枝杆菌阳性,而以结核分枝杆菌复合群 16S rRNA 序列特异性片段为靶标的结核分枝杆菌核酸检测方法(RNA 恒温扩增)结果为结核分枝杆菌,出现两种分子生物学检测结果不一致的情况。为进一步验证检测结果的准确性,笔者又应用以 IS6110 为单靶基因的结核分枝杆菌核酸检测方法(恒温扩增荧光法),结果为结核分枝杆菌阴性,而以 *rpoB* 基因 81 bp 利福平耐药核心区域(RRDR)为靶基因的 GeneXpert MTB/RIF 检测(巢式探针-荧光定量 PCR 法),结果为结核分枝杆菌,利福平敏感。基于 4 种不同的分

子生物学检测试剂得到的检测结果存在差异,通过分析各种检测试剂的检测原理及检测靶点,怀疑为 *IS6110* 基因缺失菌株,最后通过测序技术鉴定该例患者感染菌株为 *IS6110* 基因缺失。

本例患者出现两种分子生物学检测结果不一致的情况,针对 *IS6110* 单靶点的 PCR 方法在结核分枝杆菌检测方面的可靠性会造成影响,导致假阴性结果的出现,而低拷贝菌株因其多态性有限,也同样会影响其在基因分型中的鉴定能力。因此,在结核病诊断方面需联合其他的基因靶点,如 MPB64、MTP40、16S rRNA、hsp65 等组成多重 PCR 法提高临床标本中分枝杆菌检测的准确性。

除了选择合适的靶基因,不同原理的分子生物学检测技术对结核分枝杆菌核酸检测阳性率也有一定的差异。本例患者应用 4 种方法对结核分枝杆菌进行核酸检测,在实际应用中都有可能出现假阳性或假阴性的情况,无法对原始标本中结核分枝杆菌拷贝数实现绝对定量。数字聚合酶链式反应(digital polymerase chain reaction, dPCR)是一项基于单分子目标基因 PCR 扩增的绝对定量技术,比标准实时反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)具有更高的敏感度和准确性,且 dPCR 具有无需循环 CT 值和标准曲线即可实现样品中 DNA 分子绝对定量的优点^[9],未来可能对于低浓度和低拷贝的结核分枝杆菌核酸检测具有广泛的应用前景,但还需进行更多的研究加以证实。

综上,基于目前结核分枝杆菌的分子生物学检测诊断试剂的广泛应用,要警惕单拷贝或者零拷贝分离株对以 *IS6110* 为靶点的分子检测可能造成假阴性结果的可能。实验室检

测人员需要对不同检测试剂的检测原理进行熟练掌握,当不同试验的检测结果出现不一致时,要积极协助临床进行分析,以免出现错误判断,延误患者的诊断与治疗。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会. 结核病原学分子诊断专家共识. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(9): 688-695. doi:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2018.09.008.
- [2] Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. J Clin Microbiol, 1990, 28(12): 2668-2673. doi:10.1128/JCM.28.12.2668-2673.1990.
- [3] Gagneux S, Small PM. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. Lancet Infect Dis, 2007, 7(5):328-337. doi:10.1016/S1473-3099(07)70108-1.
- [4] Mokrousov I, Ly HM, Otten T, et al. Origin and primary dispersal of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: clues from human phylogeography. Genome Res, 2005, 15(10): 1357-1364. doi:10.1101/gr.3840605.
- [5] 谢彤,孙蕊,巨韩芳,等. 结核分枝杆菌北京基因型菌株大片段的多态性研究. 中国防痨杂志, 2018, 40(3): 269-273. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2018.03.011.
- [6] 刘东鑫. 中国结核分枝杆菌耐药特征研究及新型恒温扩增诊断方法的建立. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019.
- [7] 刘美伶. 华东部分地区 W-北京基因型结核分枝杆菌传播特征研究. 上海: 复旦大学, 2013.
- [8] 裴秀英,戴寿芝,王民,等. *IS6110*-限制性片段长度多态性 DNA 分型在结核分子流行病学研究中的应用. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 18-20. doi:10.3760/j.issn:1001-0939.2002.01.006.
- [9] Whale AS, Bushell CA, Grant PR, et al. Detection of Rare Drug Resistance Mutations by Digital PCR in a Human Influenza A Virus Model System and Clinical Samples. J Clin Microbiol, 2016, 54(2): 392-400. doi:10.1128/JCM.02611-15.

(收稿日期:2020-11-07)

(本文编辑:郭萌)