

应用 MPB64 抗原检测快速鉴定结核分枝杆菌的研究

沈建山, 张丽水, 黄明翔(福建省福州肺科医院检验科 350008)

【摘要】 目的 评价检测分枝杆菌 MPB64 抗原对快速鉴别分枝杆菌菌种的价值。**方法** 采用结核分枝杆菌 MPB64 抗原胶体金法和传统对硝基苯酸(PNB)生长实验,对 652 株分枝杆菌临床分离株进行鉴别并比较分析。**结果** 两种方法的检测结果相符 647 株,不符 5 株,符合率 99.2%(647/652),两种方法对分枝杆菌复合群检出率差异无统计学意义($P>0.05$),用胶体金法检测结核分枝杆菌复合群敏感性为 99.1%,特异性为 100.0%。**结论** 与 PNB 方法相比,分枝杆菌 MPB64 抗原胶体金法有较高的特异性和灵敏性,方法简便、快速,是分枝杆菌菌种鉴别的有效方法。

【关键词】 结核分枝杆菌; 非结核分枝杆菌; 牛分枝杆菌 MPB64; 快速鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.15.029 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)15-1881-02

Application of MPB64 antigen detection for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis SHEN Jian-shan, ZHANG Li-shui, HUANG Ming-xiang (Department of Clinical Laboratory, Fuzhou Pulmonary Hospital, Fujian 350008, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the method of rapid identification of mycobacterium species by distinguishing mycobacterium MPB64 antigen. **Methods** Total 652 clinical isolated mycobacterium tuberculosis were tested by Colloidal gold method, and compared with the method of the traditional growth experiments of nitrobenzene acid (PNB). **Results** The matching test result of two methods was 647, and not matching was 5. The incidence rate of two methods was 99.2% (647/652). The two methods were not different in the detection rates of the composite group of mycobacterium ($P>0.05$). The sensitivity of the colloidal gold method of mycobacterium tuberculosis complex group was 99.1%, while the specificity was 100.0%. **Conclusion** Comparing with the PNB method, mycobacterium MPB64 antigen colloidal gold has high specificity and sensitivity, that is a simple, fast, effective method for the identification of mycobacterium species.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; non-mycobacterium tuberculosis; MPB64 antigen; rapid identification

中国结核病疫情属全球 22 个高负担国家之一,全国约 5.5 亿人感染结核菌,其中活动性肺结核 450 余万人,每年新发肺结核 200 万人,约 13 万人因结核病死亡。而中国由于气候、环境等因素,类似于结核杆菌的非结核分枝杆菌 (NTM) 感染乃至于发病,也已引起国内外广泛关注。目前,国内外发现的致病、非致病 NTM 约 200 多种,给人们健康和临床诊治带来严重威胁。据 2000 年全国结核病的流行病学调查结果显示,中国人口 NTM 感染率已由 1985 年的 4.2% 和 1990 年的 4.9% 上升到 2000 年的 11.1%,具有明显的上升趋势^[1]。当今中国 NTM 肺病不仅常见,而且还多次暴发 NTM 皮肤软组织感染事件。NTM 感染的临床症状和 X 线表现与结核相似,难以鉴别,且多数非结核分枝杆菌对抗结核药物有天然耐药性,因此结核分枝杆菌和 NTM 感染的正确鉴定对于疾病的诊断和治疗至关重要^[2]。

目前,对于经培养获得的临床分离株菌型鉴定方法,无论是传统的 PNB 法或是近年兴起的分子生物学方法都需要较长的时间,且操作复杂。为了满足临床需要,寻找一种简单、快速的菌型鉴定方法显得十分必要。本实验利用结核分枝杆菌胶体金法检测该菌分泌的 MPB64 特异性蛋白^[3],对经 BACTEC MGIT 960 培养阳性的菌株进行菌种鉴定,同时与传统的鉴定法进行比较,以评价其在分枝杆菌菌种鉴定中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本来源于本院 2010 年 1~6 月门诊及住院

患者送检痰结核菌培养 1 221 例。BACTEC960 培养阳性经抗酸染色证实为分枝杆菌 652 例。质控菌株:结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv (ATCC27294),偶然分枝杆菌 (ATCC6841),来源于北京胸科医院国家参比实验室。

1.2 试剂 抗酸染色液、改良酸性罗氏培养基、PNB 培养基、TCH 培养基及生化鉴定的试剂为本实验室参照《全国结核病细菌学检验规程》自配^[4]。结核分枝杆菌 MPB64 抗原胶体金检测试剂盒购自杭州创新生物检控技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本前处理 在痰瓶中加入 6% 的 NaOH 20 mL,充分混匀后,倒入专用离心管中,置震荡器上震荡 15 min,待痰液完全消化后,加入 25 mL 生理盐水缓冲后置于 4 000 r/min 离心机中离心 20 min。弃去上清,用 2~3 mL 生理盐水稀释沉淀物,取约 50 μ L 接种到 BACTEC MGIT 960 培养管。

1.3.2 分枝杆菌培养 美国 BD 公司 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌检测仪培养,一旦有阳性,系统会自动报告,经抗酸染色为分枝杆菌者进一步做药物敏感性试验和菌种鉴定。

1.3.3 分枝杆菌传统菌种鉴定 从 BACTEC MGIT 960 培养管中吸取阳性培养物分别做对硝基苯甲酸 (PNB) 生长试验、噻吩-2-羧酸胍 (TCH) 试验、耐热触酶试验^[4]。结果判断:结核分枝杆菌复合群 PNB(-)、TCH(+),耐热触酶试验(-);非结核分枝杆菌 PNB(+),TCH(+),耐热触酶试验(+).

1.3.4 MPB64 抗原胶体金法及结果判定 直接吸取 BACTEC

MGIT 960 培养管中液体培养上清液 100 μ L 加入结核菌胶体金试验板的检测孔中,15 min 后观察结果。结果判定:检测区和控制区均出现紫红色条带为阳性结果,在控制区出现紫红色条带,而在检测区未出现为则阴性结果;如果控制区未出现任何条带则需重新检测。

1.4 统计学处理 采用 χ^2 检验方法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MPB64 抗原胶体金法 使用试剂盒检测结核分枝杆菌 H37Rv,结果为阳性;检测偶然分枝杆菌结果为阴性;检测 652 株临床分离菌株,阳性结果 573 株,阴性结果 79 株。

2.2 PNB 生长实验 使用 PNB 培养基对偶然分枝杆菌、结核分枝杆菌 H37Rv 和临床标本进行鉴定,偶然分枝杆菌培养均为阳性,H37Rv 培养为阴性;652 株临床分离株中 74 例培养阳性,属非结核分枝杆菌;578 例培养阴性属结核分枝杆菌复合群。

2.3 MPB64 抗原胶体金法与传统鉴定法符合性及检测的敏感度、特异度 MPB64 抗原胶体金检测法检测 H37Rv、偶然分枝杆菌结果与 PNB 培养基鉴定一致;对 652 株临床分离菌株,两种方法的检测结果相符 647 株,不符 5 株,符合率 99.2% (647/652),两种方法对分枝杆菌复合群检出率分别为传统鉴定法 88.7% (578/652),MPB64 抗原胶体金法 87.9% (573/652),两者差异无统计学意义 ($P>0.05$)。用胶体金法检测结核分枝杆菌复合群敏感性为 99.1%,特异性为 100.0%。

3 讨 论

据目前所知,自然界中有致病性和非致病分枝杆菌(*Mycobacterium*, M.)200 多种,其中除结核分枝杆菌复合群、麻风分枝杆菌等外,其余统称为 NTM。全国一项调查表明,在 441 例痰培养分枝杆菌阳性病例中,经过菌种鉴定,含牛结核分枝杆菌在内的结核分枝杆菌复合群为 88.9%,其中真正属于结核分枝杆菌者只有 86.4%,而 11.1% 为 NTM^[5]。福建 NTM 的比例则更高(13.3%)^[5]。NTM 肺病在临床症状、肺部 X 线影像常与肺结核相似,同样也可以在痰涂片抗酸染色检验时发现阳性。但其中绝大多数对抗结核药物并不敏感,往往导致治疗失败。因此,分枝杆菌的快速菌种鉴定对结核病诊疗具有极为重要的意义。基因检测方法要求配置价格昂贵的仪器,且操作技术复杂,无法在基层医院推广应用。中国传统的分枝杆菌菌种鉴定方法需要 1 个月的时间,不利于对疾病的快速诊断。因此,市场迫切需要快速、简便的鉴别方法。

MPB64 抗原是结核分枝杆菌在生长繁殖中分泌的相对分子质量为 24×10^3 的蛋白质,是一种有特殊作用的分泌蛋白,主要存在于结核分枝杆菌复合群菌,NTM 极少数出现阳

性^[6]。MPB64 抗原胶体金法利用胶体金技术检测结核菌产生的特异性外分泌蛋白 MPB64,其操作简便,只需 15 min 便能获得结果,与传统 PNB 生长实验相比,检测时间大大缩短了。本研究将该方法与传统的 PNB 生长实验做比较,以结核分枝杆菌 H37Rv、偶发分枝杆菌标准株做参照,同时检测了 652 例样本。对样本检测显示,该方法结果与 PNB 生长实验符合率高达 99.2%,两者对于临床分离菌株的结核分枝杆菌复合群检出率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本实验中 5 株结核分枝杆菌用该方法检测为阴性,可能为结核杆菌分离株 MPT64 编码基因发生基因突变,产生 TGA 终止码,部分 C 末端区域缺失^[7]。

综上所述,MPB64 抗原胶体金法具有操作简单、快速、灵敏度高、特异性好等特点,可作为结核分枝杆菌复合群与 NTM 快速鉴别的有效方法之一,且适于各级实验室使用。

参考文献

[1] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导小组. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2002,24(2):102.

[2] Katoch. VM1 newer diagnostic techniques for tuberculosis [J]. Indian J Med Res,2004,120(4):418-428.

[3] Abe C,Hirano K,Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immuno-chromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal anti-bodies [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (11): 3693-3697.

[4] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志,1996,18(2):80-85.

[5] 刘坦业,江秀文,俞文诚. 福建省非结核分枝杆菌感染流行情况[J]. 中国人兽共患病杂志,1995,11(1):53-55.

[6] Abe K,Hara M. Improvement for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies with H₂O₂ addition; trial on blood culture samples [J]. Rinsho Byor,2002,50(11):1067-1071.

[7] Monteros D,Gutierrez M,Samper S,et al. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*; intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism [J]. Clin Microbiol,2001,36(1):239-242.

(收稿日期:2012-04-15)

(上接第 1880 页)

stress while increasing malignant burden of spontaneous mammary tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106 (52):22393-22398.

[4] 宿秀娟. 乳腺癌患者的心理分析及护理干预措施[J]. 中国伤残医学,2009,17(1):75.

[5] 袁秀花,毕新萍,贾凤莲. 乳腺癌患者的心理分析和护理 [J]. 中国医药导报,2007,4(28):473.

[6] Farren AT. Power, uncertainty, self-transcendence, and quality of life in breast cancer survivors[J]. Nurs Sci Q, 2010,23(1):63-71.

[7] 毛雪琴,潘芳,孙靖中,等. 围术期乳腺癌患者情绪的观察 [J]. 中华护理杂志 2004,39(6):422-424.

[8] 马环兴,杨杰民. 45 岁以下乳腺癌根治术患者的心理分析及护理干预[J]. 解放军护理杂志,2006,23(2):395

[9] Calvio L,Peugeot M,Bruns GL,et al. Measures of cognitive function and work in occupationally active breast cancer survivors[J]. J Occup Environ Med,2010,52(2): 219-227.

(收稿日期:2012-03-18)