

基于85B mRNA的逆转录-实时定量聚合酶链反应对肺结核分枝杆菌感染的诊断价值

张菊侠 杨万福

【摘要】目的 探讨痰液样本中检测结核分枝杆菌(MTB) 85B mRNA的逆转录-实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)对MTB感染的诊断价值。**方法** 分别纳入2016年1月至2016年12月陕西省结核病防治院经痰培养法(BACTEC MGIT 960系统)确诊为MTB阳性患者60例为试验组, 60例无MTB感染的健康人为对照组。提取痰液样本核酸, 分别采用TaqMan法检测MTB基因中编码16S rRNA的DNA序列和RT-qPCR法检测MTB的85B mRNA, 比较两种方法的诊断效能(敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性)。**结果** TaqMan法诊断MTB感染的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性分别为93.3%、83.3%、84.9%、92.6%和88.3%; RT-qPCR法分别为98.3%、95.0%、95.2%、98.3%和96.7%。通过二元Logistics回归分析证实基于85B mRNA的RT-qPCR法对MTB感染鉴别能力更强($OR = 19.924$, 95% CI : 5.364~73.012, $P < 0.001$)。**结论** 基于结核分枝杆菌85B mRNA的RT-qPCR方法能够快速、有效诊断MTB感染。

【关键词】 结核分枝杆菌; 逆转录-定量聚合酶链反应; 诊断

Diagnostic value of reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* infection based on 85B mRNA Zhang Juxia, Yang Wanfu. The Six Branch of Shanxi Tuberculosis Control Hospital, Shanxi 710100, China

Corresponding author: Yang Wanfu, Email: yangwf1800@163.com

【Abstract】Objective To investigate the diagnostic value of reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) targeting 85B mRNA of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in sputum samples for MTB infection. **Methods** Total of 60 cases with MTB infection in the experimental group by sputum culture method (BACTEC MGIT 960 system) in the Six Branch of Shanxi Tuberculosis Control Hospital from January 2016 to December 2016 were selected as research group, while 60 healthy people without MTB infection were collected as control group. The nucleic acids were extracted from sputum samples. The DNA sequence encoding 16S rRNA of MTB was detected by TaqMan method and the 85B mRNA of MTB was detected by RT-qPCR method, then the diagnostic efficacy (including sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy) of the two methods were compared. **Results** The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy of TaqMan method for the diagnosis of patients in research group were 93.3%, 83.3%, 84.9%, 92.6% and 88.3%, respectively; which were 98.3%, 95.0%, 95.2%, 98.3% and 96.7% of RT-PCR, respectively. The binary Logistic regression analysis confirmed that RT-qPCR based on 85B mRNA was more optimal to diagnose MTB infection ($OR = 19.924$, 95% CI : 5.364-73.012, $P < 0.001$). **Conclusions** RT-qPCR targeting 85B mRNA of MTB could rapidly and effectively diagnose the status of MTB infection.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction; Diagnosis

肺结核病诊断最常用的方法是出现可疑症状和体征后采用抗酸染色显微镜下直接观察结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)进行初步诊断, 但其敏感性仅为50%~60%^[1-3]。因

MTB增殖速度极度缓慢, 作为金标准的痰培养法(BACTEC MGIT-960系统)至少需2周以上时间才能获得检测结果, 常延缓治疗起始时机^[4]。故目前的诊断策略侧重于在保证诊断敏感性和特异性的前提下尽可能缩短检测耗时, 包括针对MTB的DNA或核糖体RNA(ribosome RNA, rRNA)等核酸检测, 因选择的检测靶点不同, 不同研究中心间

的诊断效能一致性较差^[5-6]。MTB在增殖过程中通过能量依赖途径分泌大量的抗原85复合物,该复合物由3个分子量为30~32 kDa蛋白质组成,而其中的85B蛋白存在于MTB所有亚型中,并具MTB序列保守性和种属特异性^[7-9],更适用于MTB的诊断和筛查。鉴于mRNA降解速度较rRNA或DNA更快,故针对mRNA的检测更适合于MTB现症感染的检测,因此本研究以MTB的85B mRNA为检测靶点,通过逆转录-实时定量聚合酶链反应(reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)方法评估痰样本中85B mRNA检测对MTB感染的诊断价值,现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

本研究经陕西省结核病防治院伦理委员会讨论通过[(2019)年临审第(2)号],所有患者签署知情同意书。纳入2016年1月至2016年12月于本院确诊的肺结核病患者。

1. 纳入标准:①年龄 \geq 18周岁;②经BACTEC MGIT-960全自动快速分枝杆菌培养鉴定仪检测并鉴定为MTB感染;③符合临床症状咯痰 $>$ 2周、午后发热、盗汗、体重减轻等症状,且经胸部影像学确诊;④未经任何抗结核治疗。

2. 排除标准:①有抗结核治疗史;②合并系统性免疫疾病、肝肾功能不全;③贫血;④妊娠期等。

3. 本研究共纳入60例MTB痰培养阳性的肺结核病患者作为试验组,平均年龄为(46.5 \pm 12.3)岁,其中男性36例、女性24例。同期选择60例按年龄、性别一一匹配、且经BACTEC MGIT-960全自动快速分枝杆菌培养鉴定仪确诊无MTB感染的健康体检者为对照组,平均年龄为(46.5 \pm 12.3)岁,其中男性36例、女性24例。

二、检测方法

1. 痰液样本采集及保存:试验组患者于清晨收集痰液标本,对照组为体检当日上午收集口腔痰液或唾液标本。标本均留取5 ml,其中2 ml进行BACTEC MGIT-960快速培养,剩余3 ml加入15 ml离心管中,加入3 ml的4% NaOH,漩涡振荡混匀,室温放置15~20 min。13 000 r/min离心5 min(离心半径 $r = 6.0$ cm),弃上清,再加入1 ml生理盐水重悬洗涤,13 000 r/min离心5 min,弃上清。处理后的

标本分装为2份,储存于 -80 °C冰箱中,用于后续DNA或RNA提取。

2. MGIT 960法:采用美国Becton Dickinson公司生产的MACTEC-MGIT 960快速培养仪进行。将2 ml痰液标本接种于MGIT培养管中进行培养,荧光强度记忆探测器每隔60 min测定培养管内荧光强度,以生长指数(growth index, GI)值报告结果。

3. TaqMan法检测DNA:通过口腔拭子基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取痰样本中的DNA,使用市售COBAS TaqMan 48 MTB试剂盒(罗氏公司,瑞士)在COBAS TaqMan 48分析仪(罗氏公司,瑞士)中进行PCR检测反应。每个PCR反应中加入50 μ l的DNA提取物,数据结果由COBAS TaqMan 48分析仪自动分析生成。其中,TaqMan探针序列靶向于MTB基因组中编码16S rRNA的保守DNA序列,探针序列为5'-FAM-TCGAGTGACCCGGCATGGGAGCGT-Tamra-3'。

4. RT-qPCR法检测85B mRNA:通过Trizol(Sigma公司,美国)法手工提取痰样本中总RNA,并经Nanodrop 2000定量后利用PrimeScript[™] RT Master Mix RNA逆转录试剂盒(TaKaRa公司,大连)将1 μ g总RNA于20 μ l体系中逆转录成cDNA,并稀释10倍,取5 μ l cDNA产物采用TB Green[™] Fast qPCR Mix试剂盒(TaKaRa公司,大连)进行RT-qPCR反应,于LightCycler 480荧光定量PCR仪中检测、并自动分析结果。RT-qPCR方法检测85B mRNA的引物为:正向5'-TCAGGGGATGGGGCCTAG-3',反向5'-GCTTGGGGATCTGCTGCGTA-3',PCR产物长度为130 bp。

三、统计学处理

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。患者例数(%)均为计数资料,统计分析采用秩和检验,并计算TaqMan法和RT-qPCR法在试验组和对照组中针对MTB感染的诊断敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性。以二元Logistics回归分析比较TaqMan法和RT-qPCR法对MTB感染的诊断价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、TaqMan法、RT-qPCR法与MGIT 960法的检测结果

TaqMan法对MTB感染的诊断阳性率为93.3%,

低于金标准BACTEC MGIT 960系统（100%），差异具有统计学意义（ $\chi^2 = 4.138$ 、 $P = 0.042$ ）；RT-qPCR法的诊断阳性率为98.3%，与BACTEC MGIT 950系统所检测的阳性率差异无统计学意义（ $\chi^2 = 1.008$ 、 $P = 0.135$ ）。对照组标本RT-qPCR对结核分枝杆菌的阴性诊断率（95.0%）高于TaqMan法（83.3%），差异具有统计学意义（ $\chi^2 = 4.227$ 、 $P = 0.040$ ），见表1。

二、TaqMan法和RT-qPCR法的诊断效能

RT-qPCR对MTB感染的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性均显著高于TaqMan法，见表2。

三、TaqMan法和RT-qPCR法的诊断价值

诊断价值是进一步比较两种方法的诊断效能，通过年龄、性别校正后的结果比较。基于85B mRNA的RT-qPCR法能够有效鉴别结核分枝杆菌感染者（ $OR = 19.924$ ，95%CI: 5.364~73.012， $P < 0.001$ ），而TaqMan法的诊断价值较低（ $P = 0.095$ ），见表3。

表1 TaqMan法、RT-qPCR法与MGIT 960法检测MTB感染的阳性率[例(%)]

检测方法	试验组 (60例)	对照组 (60例)	χ^2 值	P值
MGIT 960法			120.000	< 0.001
阳性	60 (100.0)	0 (0.0)		
阴性	0 (0.0)	60 (100.0)		
TaqMan法			71.246	< 0.001
阳性	56 (93.3)	10 (16.7)		
阴性	4 (6.7)	50 (83.3)		
RT-qPCR法			104.650	< 0.001
阳性	59 (98.3)	3 (5.0)		
阴性	1 (1.7)	57 (95.0)		

表2 TaqMan法和RT-qPCR法的诊断效能(%)

指标	TaqMan法	RT-qPCR法
敏感性	93.3	98.3
特异性	83.3	95.0
阳性预测值	84.9	95.2
阴性预测值	92.6	98.3
准确性	88.3	96.7

表3 TaqMan法和RT-qPCR法诊断价值的二元Logistics回归分析

检测方法	B值	SE值	Wald χ^2 值	P值	OR值	95%CI
常量	2.473	1.715	2.080	0.149	11.858	0.872~19.242
TaqMan法	1.204	0.720	2.794	0.095	3.332	0.812~13.669
RT-qPCR法	2.992	0.670	19.968	< 0.001	19.924	5.364~74.012

注：常量为校正年龄、性别后基线统计值

讨 论

WHO在2015年的全球结核病报告中指出，全球约有1 040万例新增结核病患者，其中48万例为多药耐药结核病，而结核病死亡人数上升至140万人，成为全球十大死因之一^[10]。潜伏性MTB感染者进展至活动性肺结核病的风险极高，故建议MTB感染潜伏期患者接受预防性化疗等在内的感染控制方案以降低活动性肺结核发病风险^[11-13]。目前针对肺结核病的有效管理包括及时诊断结核病^[14]。痰培养法是肺结核病诊断的金标准，理论上也是药物治疗监测的金标准，但痰培养法耗时较长，延误肺结核的早期治疗时机^[15-16]。故快速、有效、尽早诊断MTB感染对肺结核的早期治疗具有极其重要的临床指导价值。

本研究确定基于MTB的85B mRNA的RT-qPCR检测方法诊断肺结核病的灵敏度和特异度分别为98.3%和95.0%。Montenegro等^[17]评估基于85B mRNA检测的RT-qPCR法在肺结核病诊断中的价值，通过分析56例肺结核病患者在抗结核治疗前的痰培养和RT-qPCR结果后发现，仅有51份痰培养阳性、而52份RT-qPCR检测阳性，提示RT-qPCR的诊断价值不劣于痰培养。而在Therese等^[18]对肺结核病患者的301份痰标本使用半定量RT-PCR检测后发现85B mRNA检测的特异性达100%、敏感性达69.1%，其中有82例肺结核病痰培养呈阴性但RT-PCR检测阳性。Chen等^[19]针对MTB的IS6110 DNA检测的诊断价值研究中发现，41例肺结核病患者中有70%患者在治疗开始后4周才提示DNA检测阳性，而痰培养阳性率仅为32%。本研究也证实了基于MTB基因组中保守DNA序列检测的TaqMan法诊断肺结核病的灵敏度和特异度均低于基于85B mRNA的RT-qPCR法。进一步将MGIT 960法诊断结果作为因变量、TaqMan或RT-qPCR法结果作为自变量进行二元Logistic回归分析后证实基于MTB 85B mRNA的RT-qPCR法能够有效诊断MTB感染（ $OR = 19.924$ ，95%CI: 5.364~73.012， $P < 0.001$ ）。因mRNA的降解速度极快，阳性检测结果反映活菌感染状态，在有效抗结核治疗后转为阴

性^[20],故笔者认为基于85B mRNA检测方法更适合于诊断MTB的活菌感染状态和疗效评估。

文献报道,85B mRNA检测已用于肺结核病或肺外结核病的疗效评估^[21]。因结核分枝杆菌增殖速度缓慢,基于DNA的检测手段往往不能及时区分活菌或死菌。Li等^[22]比较MTB 85B mRNA、16S rRNA和IS6110 DNA检测对抗结核疗效的时效预测,结果发现85B mRNA在抗结核治疗开始后即出现降低趋势,且治疗有效患者在治疗第7天时85B mRNA检测呈阴性,但16S rRNA的检测转阴时间长于85B mRNA,而IS6110 DNA在治疗7天后仍表现为强阳性,提示痰标本中MTB的85B mRNA的快速消失不仅是反映MTB活力的有效指标,也是快速评估药物应答的有效指标。

抗原85B参与MTB的细胞壁生物合成,因而作为潜在的免疫应答靶点。Wilkinson等^[23]报道,细胞内MTB感染的24 h内,85B mRNA水平迅速增加54倍以上,而16S rRNA仅升高14.6倍。通过抗原85B的DNA或纯化的抗原85B蛋白可诱导机体产生抗原特异性较强的CD4⁺ T细胞,从而通过增加干扰素的分泌而预防结核病^[24-26]。

综上,本研究证实了基于结核分枝杆菌85B mRNA的RT-qPCR方法能够快速、有效诊断肺结核MTB感染,对肺结核病的病原学诊断和早期治疗具有重要的指导价值。

参 考 文 献

- [1] Olaru ID, Heyckendorf J, Grossmann S, et al. Time to culture positivity and sputum smear microscopy during tuberculosis therapy[J]. *LS One*,2014,9(8):e106075.
- [2] Cirillo DM, Cabibbe AM, De Filippo M R, et al. Use of WGS in mycobacterium tuberculosis routine diagnosis[J]. *Int J Mycobacteriol*, 2016,5(Suppl 1):S252-S253.
- [3] Shenai S, Armstrong DT, Valli E, et al. Analytical and clinical evaluation of the epistem genedrive assay for detection of mycobacterium tuberculosis[J]. *J Clin Microbiol*,2016,54(4):1051- 1057.
- [4] 杨顺利, 范梦柏, 商亚丽, 等. BACTEC-MGIT 960快速分离培养结核杆菌实验室检测效果分析[J]. *中国药物与临床*,2015,15(10):1501-1503.
- [5] Pérez-Osorio AC, Boyle DS, Ingham ZK, et al. Rapid identification of mycobacteria and drug-resistant *mycobacterium tuberculosis* by use of a single multiplex PCR and DNA sequencing[J]. *J Clin Microbiol*,2012,50(2):326-336.
- [6] Sabeel SM, Salih MA, Ali M, et al. Phenotypic and genotypic analysis of multidrug-resistant *mycobacterium tuberculosis* isolates from sudanese patients[J]. *Tuberc Res Treat*,2017:8340746.
- [7] 武学成, 唐曙明. 痰样结核杆菌抗原85B mRNA检测在肺结核疗效评价中的应用[J]. *热带医学杂志*,2015,15(8):1017-1019.
- [8] 高岭, 常娅莉, 张虎. PCR快速检测结核分枝杆菌的临床观察[J]. *重庆医学*,2017,46(1):187-188.
- [9] Demirci M, Saribas S, Ozer N, et al. Diagnostic performance of the RT-qPCR method targeting 85B mRNA in the diagnosis of pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *J Infect Public Health*,2018,11(5):662-666.
- [10] Gulland A. More cases of tuberculosis than previously thought, WHO reports[J]. *BMJ*,2016,355:i5562.
- [11] 穆丽平. 传染性肺结核患者亲密接触者结核感染情况及危险因素分析[J]. *中国现代医药杂志*,2017,19(11):76-78.
- [12] Leung-Theung-Long S, Coupet CA, Gouanic M, et al. A multi-antigenic MVA vaccine increases efficacy of combination chemotherapy against *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *PLoS One*,2018,13(5):e0196815.
- [13] Coeck N, Jong BCD, Diels M, et al. Correlation of different phenotypic drug susceptibility testing methods for four fluoroquinolones in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Antimicrob Chemother*,2016,71(5):1233-1240.
- [14] Stagg HR, Zenner D, Harris RJ, et al. Treatment of latent tuberculosis infection: a network meta-analysis[J]. *Ann Intern Med*,2014,161(6):419-428.
- [15] 黄晓伟, 吴艳红. 878例肺结核患者痰培养结果分析[J]. *现代预防医学*,2016,43(4):762-764.
- [16] 吴皖卿, 张坚华, 刘勤连, 等. 1 976例肺结核患者痰培养及其药敏检测的分析[J]. *现代预防医学*,2013,40(19):3687-3690.
- [17] Montenegro RA, Guarines KM, Montenegro LM, et al. Assessment of messenger RNA (mRNA) of *mycobacterium tuberculosis* as a marker of cure in patients with pulmonary tuberculosis[J]. *J Appl Microbiol*,2014,117(1):266-272.
- [18] Therese KL, Gayathri R, Dhanurekha L, et al. Detection of mycobacterium tuberculosis directly from sputum specimens & phenotypic drug resistance pattern of *M. tuberculosis* isolates from suspected tuberculosis patients in Chennai[J]. *Indian J Med Res*,2012,135(5):778-782.
- [19] Chen JH, She KK, Kwong TC, et al. Performance of the new automated Abbott RealTime MTB assay for rapid detection of *mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,2015,34(9):1827-1832.
- [20] Afsar I, Afsar FS. Evaluation of laboratory diagnosis for cutaneous tuberculosis[J]. *Indian J Pathol Microbiol*,2016,59(3):274-278.
- [21] Mehta PK, Singh N, Dharra R, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the detection of a cocktail of mycobacterial antigen 85B, ESAT-6 and cord factor by immuno-PCR[J]. *J Microbiol Methods*,2016,127:24-27.
- [22] Li L, Mahan CS, Palaci M, et al. Sputum mycobacterium tuberculosis mRNA as a marker of bacteriologic clearance in response to antituberculosis therapy[J]. *J Clin Microbiol*,2010,48(1):46-51.
- [23] Wilkinson RJ, Desjardin LE, Islam N, et al. An increase in expression of a *Mycobacterium tuberculosis* mycolyl transferase gene (fbpB) occurs early after infection of human monocytes[J]. *Mol Microbiol*,2001,39(3):813-821.
- [24] 胡群英, 袁东亚, 张敏. 结核病患者外周血中CD4⁺CD25⁺调节性T细胞水平的检测[J]. *现代免疫学*,2016,36(2):96-98.
- [25] Troudt J, Creissen E, Izzo L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant ST28 used as a vaccine induces protective immunity in the guinea pig model[J]. *Tuberculosis*,2017,106:99-105.
- [26] Dai G, Rady HF, Huang W, et al. Gene-based neonatal immune priming potentiates a mucosal adenoviral vaccine encoding mycobacterial Ag85B[J]. *Vaccine*,2016,34(5):6267-6275.

(收稿日期: 2018-09-29)

(本文编辑: 孙荣华)

张菊侠, 杨万福. 基于85B mRNA的逆转录-实时定量聚合酶链反应对肺结核分枝杆菌感染的诊断价值[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2019,13(4):316-319.