

## 论著·临床研究

## 基层医院应用 MPT64 抗原鉴定非结核分枝杆菌可行性分析\*

田海兵, 蒋 慧, 张晓波, 徐佳敏, 钟 辉  
(上海市奉贤区古华医院检验科, 上海 201400)

**[摘要]** 目的 分析 MPT64 抗原鉴定非结核分枝杆菌 (NTM) 的可行性, 以便在基层医院推广应用。方法 收集 2020 年 1—12 月该院 MGIT960 全自动分枝杆菌快速培养系统在 1 177 例疑似结核患者中培养分离的菌株, 以靶向测序方法进行菌种鉴定作为“金标准”。分析荧光定量聚合酶链反应法与 MPT64 抗原鉴定 NTM 的能力。结果 1 177 例患者中分离得到分枝杆菌阳性菌株 316 例, 培养阳性率达 26.85%。运用靶向测序方法鉴定出结核分枝杆菌 (MTB) 284 例, NTM 32 例, NTM 检出率为 10.13% (32/316)。荧光定量聚合酶链反应检测 MTB 与 NTM 的灵敏度、特异度均为 100.00%。MPT64 抗原对 MTB 检测的灵敏度为 98.59%, 特异度为 100.00%, 准确性为 98.70%。结论 MPT64 抗原对 NTM 的鉴定具有较高的灵敏度和特异度, 且操作简单, 无需特定仪器, 非常适合基层医院开展。

**[关键词]** 结核分枝杆菌; 非结核分枝杆菌; MPT64 抗原; 基层医院

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2025.05.007

中图法分类号: R378.91+1

文章编号: 1009-5519(2025)05-1087-03

文献标识码: A

Feasibility analysis of using MPT64 antigen to identify non-tuberculosis  
Mycobacteria in primary hospitals\*

TIAN Haibing, JIANG Hui, ZHANG Xiaobo, XU Jiamin, ZHONG Hui

(Department of Clinical Laboratory, Guhua Hospital, Fengxian, Shanghai 201400, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the feasibility of MPT64 antigen identification of non-tuberculous Mycobacterium (NTM) in order to promote its application in primary hospitals. **Methods** A total of 1 177 suspected tuberculosis patients were cultured and isolated by MGIT960 automatic Mycobacterium rapid culture system in our hospital from January to December 2020. Targeted sequencing method was used as the gold standard for strain identification. Analyzed the ability of qPCR and MPT64 antigen colloidal gold method to identify NTM. **Results** A total of 316 positive strains of Mycobacterium were isolated from 1 177 patients, with a culture positive rate of 26.85%. 284 cases of Mycobacterium tuberculosis (MTB) and 32 cases of NTM were identified using the tNGS method, with a detection rate of 10.13% (32/316) for NTM. The sensitivity and specificity of qPCR for detecting MTB and NTM are 100.00%. The sensitivity of MPT64 antigen colloidal gold method for detecting MTB was 98.59%, specificity was 100.00%, and accuracy was 98.70%. **Conclusion**

The MPT64 antigen colloidal gold method has high sensitivity and specificity for NTM identification. This method is simple to operate, does not require specific instruments, and is very suitable for primary hospitals.

**[Key words]** Mycobacterium tuberculosis; Non-tuberculosis Mycobacterium; MPT64 antigen; Primary hospitals

结核病是由结核分枝杆菌 (MTB) 感染引起的以呼吸系统为主的传染病, 为单一传染源所致主要死因的疾病<sup>[1]</sup>。我国是结核病高负担国家之一, 约占全球感染人数的 9.7%<sup>[2-3]</sup>。近年来, 由非结核分枝杆菌 (NTM) 引起的肺部疾病呈逐年上升的趋势。NTM 引起的肺部疾病症状通常与结核病相似, 临床医生难

以区分<sup>[4]</sup>。而且 NTM 对常规的抗结核药具有天然耐药性, 往往被临床医生误以为是耐药结核病患者, 而贻误治疗<sup>[5]</sup>。因此, 对 NTM 引起的肺部疾病的鉴别诊断不仅在流行病学方面具有重要意义, 同时, 对临床医生的准确诊断和制定治疗方案显得尤为重要。鉴于实验室检测能力的限制基层医院在对 NTM 菌

\* 基金项目: 上海市奉贤区科委社会类科技发展基金项目 (奉科 20221436)。

作者简介: 田海兵 (1986—), 硕士研究生, 主管检验师, 主要从事结核病分子诊断研究。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250331.1107.006\(2025-03-31\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250331.1107.006(2025-03-31))

种鉴定、传报、治疗方面还不够重视。目前,涂片抗酸染色镜检和分枝杆菌的分离培养依然是诊断结核病的主要检测方法,但这些方法仅能说明存在抗酸菌,并不能有效区分是 MTB 还是 NTM<sup>[6]</sup>。一些分子生物学检测技术,如反向斑点杂交、基因芯片、全基因组测序、靶向测序(tNGS)等检测原理均基于 DNA 杂交和二代测序技术,具有较高的灵敏度和特异度,可作为 NTM 菌种鉴定的参考方法<sup>[7]</sup>。但这些分子生物学技术需特定的基因扩增实验室、严格的准入条件、昂贵的设备和较强的生物信息学分析能力,并不能在基层医院广泛开展。因此,建立一种快速、简便、准确的方法对培养阳性的分枝杆菌菌株区分 MTB 和 NTM 显得尤为重要。MPT64 是 MTB 生长早期即可分泌的一种蛋白,目前,仅发现 MTB 复合群能分泌该蛋白。因此,其主要用于监测 MTB 的生长情况或早期诊断 MTB 感染。MPT64 抗原操作简单,易于推广应用,能否用于 NTM 检测的研究较少见。本研究评价了 MPT64 抗原鉴定 NTM 的应用价值,分析了其在基层医院应用的可行性,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样本来源** 收集 2020 年 1—12 月就诊于本院肺科门诊的 1 177 例疑似结核病患者送检的样本,其中痰液 1 019 例,支气管灌洗液 80 例,胸腔积液 35 例,腹腔积液 28 例,尿液 15 例。本研究通过医院伦理委员会审批(伦理编号:L2022.01-3)。

**1.1.2 仪器与试剂** 美国 BD 公司 MGIT960 全自动分枝杆菌快速培养系统及配套生长指示管、韩国标准公司 MPT64 MTB 抗原检测试剂盒、珠海贝索公司 Ziehl-Neelsen 抗酸染色液、上海宏石 SLAN-96S 扩增仪等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验方法

**1.2.1.1 MGIT 液体培养** 对收集到的样本(痰液、灌洗液、胸/腹腔积液、尿液等)用 N-乙酰基 L-半胱氨酸氢氧化钠消化液进行消化去污染,接种于 MGIT960 培养管中。仪器出现阳性报警后取出经 AFB 后证实为抗酸菌判定为培养阳性,如为杂菌生长判定为污染,去污染后重新培养。如培养 42 d 后仍为阴性判定为培养阴性。

**1.2.1.2 MPT64 抗原检测** 对培养后得到的阳性菌株进行 MPT64 抗原检测。取 100  $\mu$ L 菌液滴入反应孔,10 min 内判断结果,C、T 线均显示条带判定为阳性,C 线显示 T 线不显示判定为阴性,C 线不显示条带不论 T 线是否显示均判定为无效,需重新检测,并记录结果。

**1.2.1.3 荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测** 对培养后得到的阳性菌株进行实时荧光定量 PCR 检测。

提取试剂采用上海之江生物 MTB-DNA 提取和扩增试剂。取 1 mL 菌液至 1.5 mL 离心管中 13 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀加入无菌生理盐水 1 mL 打匀,13 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。沉淀加入 100  $\mu$ L 核酸提取液充分混匀,99  $^{\circ}$ C 干浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液 4  $\mu$ L 做 PCR 反应模板,反应管置于荧光定量 PCR 仪上扩增。结果判断:循环阈值大于或等于 35 判断为阴性,循环阈值小于 35 判断为阳性。

**1.2.2 tNGS 菌种鉴定** 对培养后得到的菌株送至上海市金域检验所进行 tNGS。以 tNGS 方法作为菌种鉴定的“金标准”。具体方法为通过物理研磨和生化酶解实现高效破壁,提取病原体 DNA。以分枝杆菌高度保守区域为靶标,设计大于或等于 2 对特异性引物进行靶向扩增富集进行建库,再进行高通量测序检测病原体特异性核酸序列。最后利用生物信息学软件对测序数据进行过滤,以参考基因组进行比对,利用单核苷酸多态性位点的不同实现精准分型。

**1.2.3 质量控制** 涉及结核诊断项目均参加上海市疾病预防控制中心和上海市临床检验中心年度 2 次的质量控制,且成绩均合格。2 名从事结核检测的工作人员均具有丰富的检测经验,确保检验质量。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率或构成比表示,采用  $\chi^2$  检验;Kappa $\geq 0.75$  表明具有极好的一致性。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般资料** 1 177 例送检样本中经 MGIT960 培养后剔除同一时间、同一患者重复检出的菌株得到培养阳性菌株 316 例,培养阳性率达 26.85%。对培养液进行抗酸染色镜检证实均为分枝杆菌阳性菌株。316 例培养阳性样本中男 205 例,女 111 例,男女比例为 1.85:1;中位年龄 52 岁,< 30 岁 35 例(11.08%),30~60 岁 215 例(68.04%),> 60 岁 66 例(20.89%)。标本类型:痰液 215 例(68.04%),肺泡灌洗液 62 例(19.62%),胸/腹腔积液 30 例(9.49%),尿液 9 例(2.85%)。

**2.2 tNGS 菌种鉴定结果** 316 例阳性菌株中应用 tNGS“金标准”方法进行菌种鉴定,得出 MTB 284 例,NTM 32 例。NTM 检出率为 10.13%。tNGS 鉴定 NTM 结果见表 1。

**2.3 荧光定量 PCR 鉴定性能** 荧光定量 PCR 检测出阳性菌株 316 例,284 例 MTB 菌株中 MTB-DNA 阳性 284 例,阴性 0 例。32 例 NTM 菌株中 MTB-DNA 均为阴性。荧光定量 PCR 检测 MTB 和 NTM 的灵敏度、特异度均为 100.00%。荧光定量 PCR 与 tNGS 具有高度一致性(kappa = 1.000,  $P < 0.05$ )。

见表 2。

**2.4 MPT64 抗原鉴定性能** MPT64 抗原检测出阳性菌株 316 例, 284 例 MTB 菌株中 MPT64 抗原阳性 280 例, 阴性 4 例。32 例 NTM 菌株中 MPT64 抗原阳性 0 例, 阴性 36 例。MPT64 抗原检测 MTB 的灵敏度为 98.59%, 特异度为 100.00%, 准确性为 98.70%, MPT64 抗原与 tNGS 方法具有高度的一致性 ( $\kappa=0.930, P<0.05$ ); 检测 NTM 的灵敏度和特异度均达到 100.00%, MPT64 抗原与 tNGS 方法具有高度的一致性 ( $\kappa=1.000, P<0.05$ )。见表 3。

表 1 tNGS 鉴定 NTM 结果 ( $n=32$ )

菌株名称	拉丁文	<i>n</i>	构成比 (%)
胞内分枝杆菌	<i>M. intracellulare</i>	11	34.4
脓肿分枝杆菌	<i>M. abscessus</i>	7	21.9
缓黄分枝杆菌	<i>M. lentiflavum</i>	4	12.5
堪萨斯分枝杆菌	<i>M. kansasii</i>	4	12.5
奇美拉分枝杆菌	<i>M. chimaera</i>	2	6.3
鸟分枝杆菌	<i>M. avium</i>	1	3.1
龟分枝杆菌	<i>M. chelonae</i>	1	3.1
戈登分枝杆菌	<i>M. goodii</i>	1	3.1
隐藏分枝杆菌	<i>M. celatum</i>	1	3.1

表 2 荧光定量 PCR 鉴定性能 ( $n$ )

荧光定量 PCR	tNGS		合计
	MTB	NTM	
MTB	284	0	284
NTM	0	32	32
合计	284	32	316

表 3 MPT64 抗原鉴定性能 ( $n$ )

MPT64 抗原	tNGS		合计
	MTB	NTM	
MTB	280	0	280
NTM	4	32	36
合计	284	32	316

### 3 讨 论

NTM 是除 MTB 复合群、麻风分枝杆菌以外的一大类分枝杆菌属的总称, 有 170 多种<sup>[8]</sup>。广泛分布在自然界中, 包括空气、土壤, 甚至饮用水中, 一般为机会致病菌, 人和动物皆可感染。极少数 NTM 能引起慢性肺部疾病, 症状通常与结核病相似<sup>[9]</sup>。随着 NTM 引起的肺部疾病逐年增多的趋势, 也迫切需要一种简单、灵敏度、特异度高的检测方法, 用以区分 MTB 和 NTM。

MPT64 是 MTB RD2 区基因座中 RV1980C 基

因编码的一种特异性蛋白, 其相对分子质量大约为  $24 \times 10^3$ <sup>[10-11]</sup>。该蛋白仅能在 MTB 中分泌, 在 NTM 中不分泌。因此, 常用于 MTB 液体培养的生长指示剂和疫苗的研究<sup>[12-13]</sup>。

本研究以 tNGS 为参考方法, 评估了荧光定量 PCR 与 MPT64 抗原区分 MTB 和 NTM 的能力, 结果显示, 316 例分枝杆菌阳性菌株中鉴定出 MTB 284 例, NTM 32 例, NTM 检出率为 10.13%。荧光定量 PCR 检测 MTB、NTM 的灵敏度、特异度均为 100.00%, 与 tNGS 方法具有高度一致性 ( $\kappa=1.000, P<0.05$ )。而 MPT64 抗原检测 MTB 菌株的灵敏度为 98.59%, 特异度为 100.00%, MPT64 抗原与 tNGS 方法同样具有高度的一致性 ( $\kappa=0.930, P<0.05$ ), 检测 NTM 的灵敏度和特异度均达到 100.00%。表明 MPT64 抗原对 NTM 的检出具有较高的应用价值。同样, MPT64 抗原鉴定 NTM 具有 2 个局限性: (1) 某些 MTB 菌株在传代培养过程中编码 MPT64 蛋白区域可能会发生变异, 导致不产生该蛋白, 使检测结果为假阴性。该突变常发生于 mpt64 基因的 43~63 位区域的碱基缺失, 国内外有多篇文章进行了报道<sup>[14-16]</sup>。本研究表 3 中 4 例 MTB 菌株 MPT64 抗原检测为阴性, 可能是此原因, 需后续实验进一步证实。(2) 无论是荧光定量 PCR 还是 MPT64 抗原均仅能区分培养阳性的菌株是 MTB 或 NTM, 并不能有效区分混合感染, 也不能鉴定到具体种属。因此, 建议基层医院可将 MPT64 抗原作为检测 NTM 的辅助手段, 结果为阴性的菌株应送上级医院进行 tNGS 或反向斑点杂交等方法鉴定到具体的种属。

综上所述, MPT64 抗原鉴定 NTM 具有操作简单、灵敏度、特异度高等优势, 无需特殊仪器即可有效区分 MTB 和 NTM, 非常适合在基层医院开展。对结核病的鉴别诊断、治疗、转诊、传报方面具有较高的应用价值。

### 参考文献

- [1] CHAKAYA J, KHAN M, NTOUMI F, et al. Global tuberculosis report 2020-reflections on the global TB burden, treatment and prevention efforts[J]. Int J Infect Dis, 2021, 113 Suppl 1(Suppl 1):S7-S12.
- [2] 王晓君, 李月华, 易凤莲, 等. 1990—2017 年中国结核病流行与控制情况[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(6):856-860.
- [3] KAWAMURA L M. Too little too late: waiting for TB to come[J]. Indian J Tuberc, 2018, 65(2):106-108.
- [4] KOH W J. Nontuberculous mycobacteria-overview[J]. Microbiol Spectr, 2017, 5(1):10.
- [5] COWMAN S, VAN INGEN J, GRIFFITH D E, et al. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 2019, 54(1):1900250. (下转第 1094 页)

2021,9(6):850-859.

- [6] PRAKASH K, RYDELL G E, LARSSON S B, et al. High serum levels of pregenomic RNA reflect frequently failing reverse transcription in hepatitis B virus particles[J]. *Virology*, 2018, 15(1):86.
- [7] 邱功钦. 高敏 PCR 在 HBV 极低病毒载量人群检测中的意义分析[D]. 广州: 广州医科大学, 2023.
- [8] 张晓晶, 武瑞, 黄伟, 等. 慢性乙型肝炎不同自然病程 HBV RNA 的动态变化及与 HBsAg、HBV DNA 的相关性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(15):1832-1835.
- [9] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2022 年版)[J]. *中华传染病杂志*, 2023, 41(1):3-28.
- [10] WONG R J, KAUFMAN H W, NILES J K, et al. Simplifying treatment criteria in chronic hepatitis B: reducing barriers to elimination[J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 76(3): e791-800.
- [11] 鲁凤民, 窦晓光, 张文宏, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV RNA 检测的临床意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(5):934-938.
- [12] TESTONI B, LEBOSSE F, SCHOLTES C, et al. Serum hepatitis B core-related antigen (HBcrAg) correlates with covalently closed circular DNA transcriptional activity in chronic hepatitis B patients[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(4): 615-625.
- [13] 李彤. 经治慢性乙型肝炎低病毒血症患者人群特征及相关影响因素分析: 一项单中心横断面回顾性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- [14] 吕承秀, 陈梅, 王纪传, 等. 慢性乙型肝炎患者接受核苷

(酸)类似物治疗后发生低病毒血症的危险因素及机制研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(5):133-137.

- [15] LUO H, TAN N, KANG Q, et al. Hepatitis B virus pre-genomic RNA status can reveal the long-term prognoses of chronic hepatitis B patients treated with nucleos(t)ide analogues[J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27(3):323-328.
- [16] MAK L Y, WONG D, KUCHTA A, et al. Hepatitis B virus pre-genomic RNA and hepatitis B core-related antigen reductions at week 4 predict favourable hepatitis B surface antigen response upon long-term nucleos(t)ide analogue in chronic hepatitis B[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(1):146-162.
- [17] LUO M, ZHOU B, HOU J, et al. Biomarkers for predicting nucleos(t)ide analogs discontinuation and hepatitis B virus recurrence after drug withdrawal in chronic hepatitis B patients[J]. *Hepatol Res*, 2022, 52(4):337-351.
- [18] VAN CAMPENHOUT M J H, VAN BÖMMEL F, PFEFFERKORN M, et al. Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment[J]. *Hepatology*, 2018, 68(3):839-847.
- [19] 曾伊凡. 经 NAs 治疗的慢性乙型肝炎患者血清 HBV pgRNA 的表达及其临床意义[D]. 十堰: 湖北医药学院, 2021.
- [20] 程海林, 胡旭东, 夏冰, 等. 富马酸丙酚替诺福韦对恩替卡韦经治后低病毒载量的慢性乙型肝炎患者的临床疗效[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(3):537-540.

(收稿日期:2024-08-06 修回日期:2024-12-08)

(上接第 1089 页)

- [6] 林律, 平国华, 车洋, 等. PCR 荧光探针技术在宁波地区结核快速诊断中的应用价值分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2021, 31(19):2345-2347.
- [7] PARK Y S, LEE C H, LEE S M, et al. Rapid increase of non-tuberculous mycobacterial lung diseases at a tertiary referral hospital in South Korea[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14(8):1069-1071.
- [8] VARLEY C D, WINTHROP K L. Nontuberculous mycobacteria: diagnosis and therapy[J]. *Clin Chest Med*, 2022, 43(1):89-98.
- [9] JAMAL F, HAMMER M M. Nontuberculous mycobacterial infections[J]. *Radiol Clin North Am*, 2022, 60(3): 399-408.
- [10] 谢燕玲, 宁唤唤, 梁璇, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 MPT64 单克隆抗体的制备及其特异性[J]. *中国人兽共患病学报*, 2022, 38(5):387-393.
- [11] CAO X J, LI Y P, WANG J Y, et al. MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*[J].

*BMC Infect Dis*, 2021, 21(1):336.

- [12] 屈蓉, 吴康, 吴娟, 等. 结核分枝杆菌早期分泌蛋白 MPT64 的原核表达及其在结核病学血清学诊断上的初步应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(5):566-570.
- [13] STAMM C E, PASKO B L, CHAISAVANEYAKORN S, et al. Screening mycobacterium tuberculosis secreted proteins identifies Mpt64 as a eukaryotic Membrane-Binding bacterial effector[J]. *mSphere*, 2019, 4(3):e00354-003519.
- [14] MUHAMMAD N, KHAN M T, ALI S, et al. Novel mutations in MPT64 secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(3):2530.
- [15] 毛欣茹, 张诗蒙, 尹小毛. 结核分枝杆菌 mpt64 基因突变研究[J]. *实验与检验医学*, 2016, 34(2):137-139.
- [16] 易松林, 郭婧玮, 陈忠南, 等. MPT 抗原阴性的结核分枝杆菌复合群临床分离株 mpt64 突变特征分析[J]. *实用预防医学*, 2020, 27(6):649-651.

(收稿日期:2024-07-06 修回日期:2024-12-25)