

• 基础实验研究论著 •

膜芯片技术对结核分枝杆菌耐药性检测的研究*

李芳芳,唐曙明[△],李爱敏,侯 沪,刘彩艳

(深圳市人民医院龙华分院检验科,广东深圳 518000)

摘要:目的 验证膜芯片技术在结核分枝杆菌对利福平(RFP)、异烟肼(INH)、链霉素(SM)和乙胺丁醇(EMB)耐药性检测中的应用价值。方法 收集 393 例临床标本(包括痰液、尿液、胸腔积液、腹水标本),根据结核分枝杆菌耐药位点的 DNA 序列,设计用于检测 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL* 和 *embB* 基因常见突变类型的膜芯片,对上述临床标本进行检测,并将其与传统微生物敏感性试验结果进行比较,对不相符结果用聚合酶链反应产物直接测序(PCR-DS)进行验证。结果 以常规培养法为金标准,膜芯片法扩增结核分枝杆菌的敏感性、特异性、准确性分别为 90.4%、98.8% 和 95.7%,其对结核分枝杆菌 RFP、INH、SM 和 EMB 耐药性检测的敏感性分别为 92.3%、83.3%、68.8% 和 83.3%;准确性分别为 98.6%、97.3%、96.6% 和 98.5%;特异性均达到 100.0%。结论 膜芯片法检测结核分枝杆菌耐药性具有较高的敏感性、特异性和准确性,可作为常规微生物敏感性试验的补充。

关键词:分枝杆菌,结核; 抗药性; 微生物敏感性试验; 膜芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)21-2792-03

A study on membrane chip technique for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis**Li Fangfang, Tang Shuming[△], Li Aimin, Hou Hu, Liu Caiyan

(Department of Clinical Laboratory, Longhua Branch Hospital of Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To verify the application value of membrane chip technique in detecting resistance to rifampicin(RFP), isoniazid(INH), streptomycin(SM) and ethambutol(EMB) in *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** 393 clinical specimens(including sputum, urine, pleural effusion and ascites specimens) were collected. Membrane chip were designed to detect the common mutation types of *rpoB*, *katG*, *inhA*, *rpsL* and *embB* genes, according to DNA sequence of drug resistance loci of *Mycobacterium tuberculosis*. The clinical specimens above were detected and the results were compared with those of traditional microbial sensitivity tests, and those which did not match each other were subjected to polymerase chain reaction-direct sequencing(PCR-DS) for verification. **Results** Conventional culture method were served as golden standard, the sensitivity, specificity and accuracy of membrane chip method which used for amplifying *Mycobacterium tuberculosis* were 90.4%, 98.8% and 95.7%, respectively. Its sensitivity for detecting drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to RFP, INH, SM and EMB were 92.3%, 83.3%, 68.8% and 83.3%, respectively, its accuracy were 98.6%, 97.3%, 96.6% and 98.5%, respectively, and the specificity were all 100.0%. **Conclusion** Membrane chip method shows higher sensitivity, specificity and accuracy for detecting drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* and may be used as a supplement of routine microbial sensitivity test.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance; microbial sensitivity tests; membrane chip

全球 27 个多重耐药结核病流行情况严重的国家中,中国是其中之一,结核病年发病数约为 130 万,15 岁及以上人群肺结核的患病率为 459/100 000,肺结核患者的多重耐药率为 6.8%^[1]。结核分枝杆菌耐药性的快速检测,尤其是患者对一线抗结核药物的耐受性,在结核的治疗和疫情控制中具有重要意义。膜芯片技术是利用反向斑点杂交技术原理,在膜上固定一系列的特异性探针,扩增产物与探针进行杂交显色,以判定产物是否为目的序列的一种方法。本研究采用膜芯片技术,针对结核分枝杆菌的 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL* 和 *embB* 基因,建立了可同时检测耐利福平(rifampicin, RFP)、异烟肼(isoniazid, INH)、链霉素(streptomycin, SM)和乙胺丁醇(ethambutol, EMB)这 4 种一线抗结核药物的快速基因检测平台,并将其与传统常规培养法进行了比较,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集的 393 例临床标本均来自本院患不同疾病的

患者,其中,痰液标本 344 例,尿液标本 14 例,胸腔积液标本 19 例,腹水标本 16 例。结核分枝杆菌标准株 H37 Rv、牛分枝杆菌标准株均购自中国药品生物制品检定所。

1.2 方法**1.2.1 样本处理** 痰液标本用 2% NaOH 消化后离心集菌,其他标本直接离心集菌,每种标本分为 3 份,分别用于普通培养、膜芯片检测和聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)-序列分析。**1.2.2 微生物敏感性试验** 收集经处理的标本 0.5 mL,将其倾注至改良罗氏培养基,按结核病诊断细菌学检验规程^[2]进行培养和鉴定,采用绝对浓度法进行微生物敏感性试验。**1.2.3 样本 DNA 的制备** 收集经处理的标本 100 μ L,加入盛有 400 μ L 双蒸水的 1.5 mL 离心管中,100 $^{\circ}$ C 煮沸 15 min,离心 2 min(离心半径 8 cm, 12 000 r/min),取上清液作为 PCR 扩增模板。

* 基金项目:深圳市科技局资助项目(201102151)。 作者简介:李芳芳(1962~),女,主任技师,主要从事病原微生物的分子检测工作。

[△] 通讯作者, E-mail: tangshuming@126.com。

1.2.4 DNA 扩增 经 Genebank 数据库检索和比对分析,设计 5 对引物,用多重 PCR 技术分别扩增 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL* 和 *embB* 基因,扩增反应在一个 EP(eppendorf)管中完成,上游引物 5'端用生物素标记,反应体系如下:模板 DNA 20 ng, 10× PCR 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 上、下游引物 (25 μmol/L) 各 0.5 μL, DNA 聚合酶 2.5 U, 总体积 25 μL。循环条件为: 50 ℃ 15 min, 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 45 s, 58 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.5 扩增产物与膜芯片的杂交与结果判读 按课题组先前建立的方法设计膜芯片^[3-4], 扩增产物与膜芯片杂交后进行结果判读和分析。

1.2.6 PCR 产物直接测序 (PCR-direct sequencing, PCR-DS) 分析 将扩增产物与膜芯片的杂交结果与常规培养法检测结果进行对比, 2 种方法结果不相符者, 取储存的、经处理后的原始标本进行 PCR 扩增, 扩增产物送上海博亚生物技术有限公司进行 PCR-DS 分析。

2 结 果

2.1 微生物敏感性试验结果 在 393 例临床标本中, 共检出结核分枝杆菌 146 例, 检出阳性率为 37.2%, 其中, 耐药株 84 例, 敏感株 62 例, 耐药率为 57.5%。在 84 例耐药菌株中, 对 RFP 耐药者 26 例, 占 31.0%; 对 INH 耐药者 24 例, 占 28.6%; 对 SM 耐药者 16 例, 占 19.0%; 对 EMB 耐药者 12 例, 占 14.3%; 多重耐药者 6 例, 占 7.1%。

2.2 扩增产物与膜芯片杂交的结果 在 393 例临床标本中, 扩增阳性标本 135 例, 检出阳性率为 34.4%, 其中, 耐药株 71 例, 敏感株 64 例, 耐药率为 52.6%; 此外, 结核分枝杆菌标准株 H37 Rv 和牛分枝杆菌标准株均扩增成功。在 71 株 RFP 耐药菌中, 对 RFP 耐药者 24 例, 占 33.8%; 对 INH 耐药者 20 例, 占 28.2%; 对 SM 耐药者 12 例, 占 16.9%; 对 EMB 耐药者 10 例, 占 14.1%; 多重耐药者 5 例, 占 7.0%。在 24 例 RFP 耐药株中, 检出 16 株 (66.7%) 在 *rpoB* 基因 531 位密码子处发生 TCG→TTG 突变, 8 株 (33.3%) 在 526 位密码子处发生 CAC→GAC 突变。在 20 例 INH 耐药株中, 检出 13 例 (65.0%) 在

katG 基因 315 位密码子处发生 AGC→ACC 突变, *katG* 基因缺失者 2 例 (10.0%), *inhA* 基因突变者 5 例 (25.0%)。在 12 例 SM 耐药株中, 检出 10 株 (83.3%) 在 *rpsL* 基因 43 位密码子处发生 AAG→AGG 突变, 2 株 (16.7%) 在 *rpsL* 基因 88 位密码子处发生 AAG→AGG 突变。在 10 例 EMB 耐药株中, 检出 7 例 (70.0%) 在 *embB* 基因 306 位密码子处发生 ATG→GTG 突变, 3 例 (30.0%) 发生 ATG→CTG 突变。

2.3 常规培养法与膜芯片法的比较 在 393 例临床标本中, 常规培养法共检出结核分枝杆菌 146 例, 膜芯片法检出 135 例, 2 种方法共存在不相符的结果 17 例。膜芯片法检测结核分枝杆菌的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别为 90.4%、98.8%、95.7%、97.8% 和 94.6%。

表 1 常规培养法与膜芯片法检测结核分枝杆菌的比较

常规法 (n)	膜芯片法 (n)		
	阳性	阴性	合计
阳性	132	14	146
阴性	3	244	247
合计	135	258	393

以常规培养法为金标准, 膜芯片法对结核分枝杆菌 RFP 耐药性检测的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别为 92.3%、100.0%、98.6%、100.0% 和 98.4%; 对 INH 耐药性检测的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别为 83.3%、100.0%、97.3%、100.0% 和 96.8%; 对 SM 耐药性检测的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别为 68.8%、100.0%、96.6%、100.0% 和 96.3%; 对 EMB 耐药性检测的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别为 83.3%、100.0%、98.6%、100.0% 和 98.5%; 对多重耐药性检测的敏感性、特异性、准确性、阳性预测值和阴性预测值分别为: 83.3%、100.0%、99.3%、100.0% 和 99.3%。见表 2。

表 2 常规培养法与膜芯片法的微生物敏感性试验的比较 (n)

常 规 法	膜 芯 片 法														
	RFP			INH			SM			EMB			多重耐药		
	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计	耐药	敏感	合计
耐药	24	2	26	20	4	24	11	5	16	10	2	12	5	1	6
敏感	0	120	120	0	122	122	0	130	130	0	134	134	0	140	140
合计	24	122	146	20	126	146	11	135	146	10	136	146	5	141	146

2.4 PCR-DS 结果 采用常规培养法与膜芯片法检测, 对检测结果不相符的所有 17 例临床标本、30 例检测结果一致的临床标本及标准菌株进行 PCR-DS 分析。结果表明, 结核分枝杆菌标准株 H37 Rv、牛分枝杆菌标准株的 PCR 产物序列与 Genebank 中相应基因序列完全一致; 在 30 例结果相符标本中, 扩增产物与膜芯片杂交检出的基因突变与 PCR-DS 分析结果一致。在 17 例结果不相符临床标本中, 常规培养法检出结核分枝杆菌阳性 14 例, 阴性 3 例, 耐药 5 例; 膜芯片法检出阳性 3 例, 阴性 14 例, 耐药 1 例; PCR-DS 分析检出阳性 12 例, 阴

性 5 例, 且在 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL* 和 *embB* 基因中均未检出突变或缺失发生。

3 讨 论

研究表明, 抗菌药的滥用、治疗方案的不合理、不规则的用药、艾滋病的流行及人口流动等因素是造成结核分枝杆菌耐药的主要原因。中国肺结核患者结核分枝杆菌的初始耐药率为 16.8%, 而继发耐药率高达 46.5%, 并且有逐步增高的趋势^[1,5-7]。结核分枝杆菌的耐药使患者的治疗时间延长, 不良反应增大, 疗效降低, 费用增高, 给结核病的控制带来了极大困

难。RFP、INH、SM 和 EMB 是临床上最常见的一线抗结核药物,检测结核分枝杆菌对控制上述 4 种药物的耐药性,指导临床医师选择有效的抗结核药物,保证治疗效果及减少耐药菌株的扩散有极其重要的意义^[8]。目前临床上常规的结核分枝杆菌耐药性检测主要采用绝对浓度法和比例法进行培养,其最大的缺陷是培养时间长,至少需要 2~3 个月才能得到微生物敏感性结果,其操作烦琐,重复性差,缺乏快速诊断的优势,往往会延误患者的治疗。

国内、外大量研究证实^[9-11],结核分枝杆菌对 RFP 耐药主要是由于其编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 基因发生了突变引起,其中,90% 以上的突变发生在 507~533 位的 27 个氨基酸密码子(81 bp)组成的区域内。50%~70% 的 INH 耐药是因为 *katG* 基因的 315 位点突变,5%~10% 是因 *inhA* 基因突变引起;80% 的 SM 耐药是由核糖体蛋白 S12(*rpsL*)基因突变引起,最常见的是 43 位密码子发生 AAG→AGG 突变。EMB 耐药与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 *embB* 突变有关,主要发生在 306 位密码子处,最常见的突变为 ATG→GTG、ATG→ATA 和 ATG→CTG。本实验中,RFP 耐药菌在 *rpoB* 基因 531 位密码子处 TCG→TTG 突变的检出率为 66.7%,526 位密码子处 CAC→GAC 突变的检出率为 33.3%;INH 耐药菌在 *katG* 基因 315 位密码子处 AGC→ACC 突变的检出率为 65.0%,*katG* 基因缺失率为 10.0%,*inhA* 基因突变率为 25.0%;SM 耐药菌在 *rpsL* 基因 43 位密码子处 AAG→AGG 突变的检出率为 83.3%,88 位密码子处 AAG→AGG 突变的检出率为 16.7%;EMB 耐药菌在 *embB* 基因 306 位密码子处 ATG→GTG 突变的检出率为 70.0%,ATG→ATA 突变的检出率为 30.0%,上述突变检出率与国内、外其他研究报道结果接近^[12-15]。

本实验根据与结核分枝杆菌耐药高度相关的 5 种耐药基因(*rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL*、*embB*)突变位点来设计膜芯片,扩增引物选在耐药突变区域两端的高保守区域,同时根据不同耐药基因的突变位点设计相应的特异性探针,利用反向斑点杂交进行检测,保证了方法的特异性和敏感性。以常规培养法为金标准,膜芯片法扩增结核分枝杆菌的敏感性、特异性、准确性分别达到 90.4%、98.8% 和 95.7%,对结核分枝杆菌 RFP、INH、SM 和 EMB 耐药性检测的敏感性分别为 92.3%、83.3%、68.8% 和 83.3%;准确性分别为 98.6%、97.3%、96.6% 和 98.5%;特异性均达到了 100.0%。以上结果证实膜芯片法已符合临床诊断性试验的要求,可用于临床结核分枝杆菌耐药性的快速筛查。

本实验共检测 393 例临床标本,其中有 17 例结果不相符合。以常规培养法为金标准,共检出 14 例阳性标本,其中耐药株 5 例,膜芯片法均未检出;在另外 3 例常规培养法检测的阴性标本中,膜芯片法检出耐药菌 1 例,敏感菌 2 例。膜芯片法对 INH、SM、EMB 耐药的检出率低于传统培养法,这可能与临床标本主要为痰液,因痰液标本消化不完全,使所提取的 DNA 样本中含有 DNA 聚合酶的抑制成份有关,也可能是由于突变类型并非芯片设计的突变类型或存在其他耐药机制,具体原因尚待进一步研究证实。膜芯片法对 RFP 耐药的检出率很高,

这与突变的相对集中、探针的合理设计有关。

本实验采用 PCR 技术结合膜芯片反向点杂交的方法,可从分子水平上同时检测与结核分枝杆菌耐药性相关的 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*rpsL* 和 *embB* 五个基因突变类型,基本实现了快速、灵敏、准确地诊断结核分枝杆菌对一线抗结核药物 RFP、INH、SM 和 EMB 的耐药性的目的,在检测速度上只需 1 天时间,比传统方法快速,且具备敏感性、特异性、重复性好等优点,在实际应用中可作为常规微生物敏感性试验方法的补充,用于指导开展早期、有效的临床化疗。

参考文献

- [1] 刘宇红,姜广路,赵立平,等.第四次全国结核病流行病学抽样调查-结核分支杆菌耐药性分析与评价[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(4):224-227.
- [2] 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):28-31.
- [3] 方红辉,唐曙明,李芳芳,等.反向斑点杂交技术在结核分枝杆菌耐药性检测中的应用研究[J].实用预防医学,2008,15(5):1392-1394.
- [4] 李芳芳,方红辉,何林,等.结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药基因突变快速检测方法的建立[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):222-225.
- [5] 梁冰,黎意芬,黄瑞霞,等.耐药结核病人的耐药状况分析[J].临床肺科杂志,2011,16(6):891-892.
- [6] 许丽,杨应周,吴清芳,等.深圳市结核病一线抗结核药的耐药监测结果分析[J].中国防痨杂志,2010,32(4):204-207.
- [7] 赵玉玲,赵东阳,李辉,等.7 年结核分枝杆菌临床分离株对一线和二线抗结核药物耐药趋势监测[J].中国卫生检验杂志,2010,20(2):338-340.
- [8] 王巍,李洪敏,吴雪琼,等.结核分支杆菌五种耐药基因检测的临床应用及评价[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(11):670-673.
- [9] Nachamkin I, Kang C, Weinstein MP. Detection of resistance to isoniazid, rifampin, and streptomycin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by molecular methods[J]. Clin Infect Dis, 1997,24(5):894-900.
- [10] Telenti A, Philipp WJ, Sreevatsan S, et al. The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol[J]. Nat Med, 1997,3(5):567-570.
- [11] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009,13(11):1320-1330.
- [12] 吴雪琼,张琼,张俊仙,等.应用基因芯片分析结核分枝杆菌常见耐药基因型的研究[J].中国防痨杂志,2006,28(1):4-10.
- [13] 徐威香,雷永良,王晓光,等.丽水市结核分枝杆菌 5 种耐药基因突变分析[J].中国卫生检验杂志,2012,22(2):353-356.
- [14] 甄伟,石大伟,赵玉玲,等.耐多药结核分枝杆菌异烟肼耐药相关基因 *katG* 突变分析[J].中国防痨杂志,2013,35(3):207-209.
- [15] Zhang M, Yue J, Yang YP, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(11):5477-5482.

(收稿日期:2013-05-11)

(上接第 2791 页)

outcome in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2012,130(2):319-327.

[15] Chen D, Siddiq A, Emdad L, et al. Insulin-like growth factor-bind-

ing protein-7 (IGFBP7): a promising gene therapeutic for hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Mol Ther, 2013,21(4):758-766.

(收稿日期:2013-05-01)