

• 临床检验研究论著 •

赣州地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药基因突变特点的研究

罗一钧, 杨建林

(赣州市第五人民医院检验科, 江西赣州 341000)

摘要:目的 探讨赣州地区结核分枝杆菌利福平(RFP)和异烟肼(INH)耐药基因的突变特点。方法 采用基因芯片技术, 对 130 例涂片抗酸染色阳性、Ct 值小于 30 的痰液样本进行常见耐药基因检测。结果 130 例样本中, 34 例(26.2%)耐药, 其中耐 RFP 的 30 例(23.1%), 耐 INH 的 26 例(20.0%), 二者同时耐药的 21 例(16.2%)。RFP 耐药基因突变位点主要为 *rpoB* 基因 531 (C→T), 占 42.4%; INH 耐药基因突变位点主要为 *katG* 基因 315(AGC→ACC), 占 65.4%。结论 赣州地区结核分枝杆菌 RFP 和 INH 耐药相关基因突变特点与国内、外研究基本一致。

关键词: 分枝杆菌, 结核; 广泛耐药结核; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)09-1136-02

A study on characteristics of rifampin- and isoniazid-resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* in Ganzhou region

Luo Yijun, Yang Jianlin

(Department of Clinical Laboratory, the Fifth People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the characteristics of rifampin(RFP) and isoniazid(INH) resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* in Ganzhou region. **Methods** Gene chip technology was employed to detect common resistance genes in 130 sputum samples with smear positive acid-fast staining and Ct values less than 30. **Results** Among 130 samples, 34 samples(26.2%) were found resistance, including 30 samples(23.1%) resistant to RFP, 26 samples(20.0%) resistant to INH, and 21 samples(16.2%) resistant to both. The mainly mutation of RFP resistant gene was *rpoB* gene 531(C→T), accounting for 42.4%, while the mainly mutation of INH resistant gene was *katG* gene 315(AGC→ACC), accounting for 65.4%. **Conclusion** The mutation characteristics of RFP and INH resistance-associated genes of *Mycobacterium tuberculosis* in Ganzhou region is consistent with domestic and foreign research.

Key words: mycobacterium tuberculosis; extensively drug-resistant tuberculosis; mutation

中国是世界上 22 个结核病高负担国家之一, 已有约三分之一的人口感染了结核分枝杆菌, 受感染人数超过 4 亿, 由于耐多药结核病和艾滋病病例的增多, 结核分枝杆菌的危害性重新引起全社会重视。与此同时, 新的结核分枝杆菌检测手段不断出现并应用于临床, 提高了结核分枝杆菌感染的诊治水平。早期诊断, 特别是对涂片阴性和耐多药结核病的诊断, 是全球结核病控制工作的重点^[1]。基因芯片技术采用光导原位合成或微量点样等方法, 将核酸片段有序地固定于支持物表面, 组成密集二维分子排列, 然后与已标记待测生物样品中的靶分子杂交, 通过特定仪器对杂交信号强度进行分析, 从而判断样品中靶分子数量。目前, 已有商品化 DNA 微阵列芯片, 国内多中心验证结果表明, 该方法检测利福平(rifampicin, RFP)、异烟肼(isoniazid, INH)耐药, 其敏感性分别为 87.56% 和 80.34%, 特异性分别为 97.95% 和 95.82%^[2]。笔者采用北京博奥生物有限公司生产的基因芯片检测系统及结核分枝杆菌耐多药基因芯片检测试剂盒分析了 130 例肺结核患者样本中的 *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 基因的突变情况, 了解赣州地区结核分枝杆菌的基因突变特点。

1 材料与方法

1.1 检测菌株 结核分枝杆菌株均来自 2013 年 3~12 月于本院住院治疗的 130 例肺结核患者痰液, 涂片抗酸染色阳性。

1.2 主要仪器与试剂 主要仪器: 晶芯 LuxScan 10K-B 微阵列芯片扫描仪、晶芯 SlideWasher 芯片洗干仪、晶芯 BioMixer II 芯片杂交仪、晶芯 Extractor 36 核酸快速提取仪均为北京博

奥生物有限公司产品, ABI-7500 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 荧光定量基因扩增仪为美国 ABI 公司产品。主要试剂: 晶芯分枝杆菌核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)、晶芯结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒 (DNA-微阵列芯片法) 均为北京博奥生物有限公司产品。

1.3 检测指标 检测指标为 RFP 和 INH 的 3 个常见耐药基因 *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 启动子的野生型及不同突变型。

1.4 方法

1.4.1 核酸提取 将 10% NaOH 预处理后的痰样本去上清液, 加 80 μ L 核酸提取液后放入晶芯 Extractor 36 核酸快速提取仪中振荡 10 min, 95 $^{\circ}$ C 水浴 5 min。

1.4.2 结核分枝杆菌核酸检测 将提取的 2 μ L 核酸加入结核分枝杆菌核酸扩增液 18 μ L, 于 ABI-7500 PCR 荧光定量基因扩增仪中扩增, 阳性样本 (Ct 值小于 30) 进行耐药基因检测。

1.4.3 扩增和变性 待测样本按体系 1/2/3 上机扩增 3 h, 扩增产物变性 5 min, 立即置于冰水混合物中防止产生二级结构。

1.4.4 杂交和洗干 将变性后的扩增产物加入结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒的芯片点阵中, 置于晶芯 BioMixer II 芯片杂交仪 50 $^{\circ}$ C 杂交 2 h, 然后在晶芯 SlideWasher 芯片洗干仪中洗干。该检测试剂盒主要通过检测 RFP 和 INH 的 3 个耐药相关基因 *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 启动子的突变情况进行检测, 其中 REP 耐药相关基因 *rpoB* 检测 6 个位点, 包括 531 位 TCG→TTG、531 位 TCG→TGG、526 位 CAC→GAC、526 位 CAC→TAC、526 位 CAC→CTC、526 位 CAC→CGC、511 位 CTG→

CCG, 513 位 CAA→CCA, 513 位 CAA→AAA, 516 位 GAC→GTC, 516 位 GAC→TAC, 516 位 GAC→GGC 及 533 位 CTG→CCG 等 13 种突变型, 对于 INH 耐药相关基因 *katG* 和 *inhA* 启动子各检测 1 个位点, 分别为 *katG* 基因 315 位 AGC→ACC 和 AGC→AAC 2 个突变, *inhA* 基因启动子-15 位 C→T 突变型。

1.4.5 芯片扫描和结果判读 洗干后的芯片放入晶芯LuxScan 10K-B 微阵列芯片扫描仪中扫描, 自动进行结果判读。

2 结 果

在被检测的 130 例样本中, 34 例耐药, 占 26.2%, 其中耐 RFP 的 30 例, 占 23.1% (30/130), 耐 INH 的 26 例, 占 20.0% (26/130), 二者同时耐药的 21 例, 占 16.2% (21/130)。

2.1 *rpoB* 基因突变分析 对于 30 例耐 RFP 的检测样本中, 其中有 27 例是单个耐药位点突变, 有 3 例是 2 个耐药位点发生联合突变。531(C→T) 突变 14 例; 516(G→T) 突变 1 例, 516(A→G) 突变 2 例; 526(A→G) 突变 1 例, 526(C→G) 突变 5 例, 526(C→T) 突变 3 例; 511(T→C) 突变 5 例; 513(C→A) 突变 2 例。其中, 最易发生突变的是 531(C→T), 占 42.4% (14/30); 其次是 526(C→G) 和 511(T→C), 各占 16.7% (5/30)。

2.2 *katG* 基因突变分析 26 例耐 INH 的检测样本中, 17 例为 *katG* 基因发生突变, 且均为 315 (AGC→ACC) 位点, 占 65.4%。

2.3 *inhA* 基因突变分析 26 例耐 INH 的检测样本中, 9 例为 *inhA* 基因启动子-15 位 C→T 发生突变占 34.6%。

3 讨 论

RFP 和 INH 是治疗结核分枝杆菌感染的首选药, 特别是在短期治疗中具有重要作用。耐多药结核的产生给患者治疗带来更大困难, 包括治疗费用增加、治愈率下降、病死率增高^[3]。结核病的耐药问题是当前结核病防治的重要研究课题^[4]。因此, 尽早掌握结核病患者耐药情况对临床治疗和用药具有重要指导意义。

有研究表明, 在基层实验室中基因芯片检测对于 RFP、INH 耐药性诊断方面具有较高的敏感性和特异性, 且成本更低, 是一种值得在中国基层实验室推广的高效、快捷、安全方法, 更符合成本-效益的耐药结核病的诊断^[5]。与传统检测方法相比, 基因芯片法检测时间短、通量高。本院是目前江西省惟一一家能进行结核分枝杆菌耐药基因芯片检测的医院。基因芯片以其高敏感性、高特异性、高通量和快速检测的特点, 适应了目前结核感染, 尤其是耐药结核病的快速诊断需求, 为结核病的整体防控提供了快速、临床实用性强的分子诊断新平台, 也为结核病筛查、合理用药和疫情监控提供了高效、准确的应用指导。

本次研究发现, 赣州地区结核病患者 RFP 耐药基因最容易导致突变的是 *rpoB* 基因 531(C→T), 突变率达 42.2%, 531 位氨基酸突变是中国结核分枝杆菌与耐 RFP 有关的突变中最

常见类型, 也是对 RFP 高耐药结核分枝杆菌的 *rpoB* 基因主要突变点^[6]; 其次是 526(C→G) 和 511(T→C), 另外, 还有 3 位患者存在 2 个耐药基因位点发生联合突变, 分别是 511(T→C) 和 516(A→G)、511(T→C) 和 531(C→T)、511(T→C) 和 516(A→G)。点突变是细菌产生耐 RFP 的主要形式, 而对 RFP 高耐药结核分枝杆菌株较易发生多个密码子联合突变, 即 2 个或 3 个位点同时存在突变。在联合突变中大多数伴有 511 位的亮氨酸^[7]。在 INH 耐药基因突变中, *katG* 基因突变占主导地位; *inhA* 基因突变居次要地位, 占 34.6%。另外, 笔者发现 *katG* 基因突变中均为 315 (AGC→ACC)。符合国内、外报道的 *katG* 315 位点和 *inhA*-15 位点占 INH 耐药的 80% 以上^[8-10]。

参考文献

- [1] 逢宇, 赵雁林. 加强结核病的科学研究[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 639-642.
- [2] 柳正卫, 黄玉, 赵雁林. 结核分枝杆菌基因突变检测方法研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 748-751.
- [3] 杨辉, 张国良, 张明霞, 等. 某地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药相关基因突变特征分析[J]. 重庆医学, 2012, 41(34): 3591-3593.
- [4] 汪晓艳, 赵雁林, 逢宇, 等. 重庆市结核分枝杆菌临床分离株的基因分型及相关耐药性分析[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 668-672.
- [5] 赵冰, 时金艳, 逢宇, 等. 基因芯片结核分枝杆菌耐多药检测在地市级实验室的应用性评估[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 718-722.
- [6] 谭守勇, 谭耀驹, 黎燕琼. 对利福平耐药的结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变与耐药程度关系的探讨[J]. 中国实用内科杂志, 2004, 24(1): 27-29.
- [7] 汪保国, 陈思东, 张胜, 等. 结核分支杆菌 *rpoB* 基因突变与对利福平耐药的关系[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(7): 1022-1024.
- [8] Choi GE, Lee SM, Yi J, et al. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 3893-3898.
- [9] Chen X, Kong F, Wang Q, et al. Rapid detection of isoniazid, rifampin, and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high-resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3450-3457.
- [10] Wang F, Shen H, Guan M, et al. High-resolution melting facilitates mutation screening of *rpsL* gene associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 121-128.

(收稿日期: 2014-01-15)

(上接第 1135 页)

- [6] 李雪梅, 邱佩绵. N 端脑利钠肽前体对急性心肌梗死常规检查的可行性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(19): 2194-2195.
- [7] Sulaiman RA, Twomey PJ, Gama R. Mitigation and detection of spurious Potassium and Sodium results[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(1/2): 1-6.
- [8] 桑圣刚, 荣红. 和肽素和脑钠肽联合检测在 AMI 中的临床意义[J]. 中国急救医学, 2012, 32(5): 449-451.
- [9] 汤希凡, 秦辛玲. 高敏心肌肌钙蛋白 T 检测在急性心肌梗死诊断

中的应用[J]. 实用医学杂志, 2012, 5(5): 828-829.

- [10] 梁继伟, 苑同业. 多种心肌坏死标志物血清联合检测在急性心肌梗死早期诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1250-1251.
- [11] Staub D, Morgenthaler NG, Buser C, et al. Use of copeptin in the detection of myocardial ischemia[J]. Clin Chim Acta, 2009, 399(1/2): 69-73.

(收稿日期: 2014-02-17)