

• 检验技术与方法 •

DNA 微阵列芯片法用于检测结核分枝杆菌耐药性的研究^{*}

刘亚芹, 杨振斌, 冯冬霞, 王海英[△]

(聊城市传染病医院检验科, 山东聊城 252000)

摘要:目的 通过与传统的比例法在结核分枝杆菌耐药性检测的比较, 评价 DNA 微阵列法用于检测结核分枝杆菌耐药性的可行性。**方法** 随机抽取本院 2012 年 1 月至 2013 年 3 月从临床标本中分离培养所得的结核分枝杆菌 54 株, 通过 DNA 微阵列法和比例法分别进行异烟肼和利福平的耐药性检测并对结果进行比较分析。**结果** 以比例法为金标准, DNA 微阵列法对异烟肼和利福平的耐药检测结果与比例法的符合率分别为 75.0%、91.0%。**结论** DNA 微阵列技术适用于临床一线耐药结核分枝杆菌的快速筛查。

关键词: DNA 微阵列; 结核分枝杆菌; 核酸杂交; 药物耐受性; 突变

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)14-1910-04

Research on DNA microarray chip method for detecting drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*^{*}

Liu Yaqin, Yang Zhenbin, Feng Dongxia, Wang Haiying[△]

(Department of Clinical Laboratory, Liaocheng Municipal Infectious Disease Hospital, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the feasibility of the DNA microarray method used in detecting the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by comparing the traditional proportion method and the DNA microarray method for detecting the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** 54 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical specimens in our hospital from January 2012 to March 2013 were randomly extracted and their resistance to isonicotinic acid hydrazide (INH) and rifampicin (RFP) was detected by the DNA microarray method and the proportion method. The detection results were performed the comparative analysis. **Results** With the proportion method as the golden standard, the coincidence rates of the DNA microarray method for detecting the *Mycobacterium tuberculosis* resistance to INH and RFP were 75% and 91.0% respectively. **Conclusion** The DNA microarray technique is suitable for the rapid screening of clinical first-line drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: DNA microarray; *Mycobacterium tuberculosis*; nucleotide hybridization; drug resistance; mutation

结核分枝杆菌自 1882 年由德国科学家 Koch 发现并证明是结核病的病原体以来, 结核病的发病率和病死率曾大幅度下降, 如今, 结核病仍然是公共卫生的重大威胁^[1], 2012 年世界卫生组织报告, 估计 2011 年全球新发结核病例有 870 万, 且有 140 万人死于结核病^[2]。同时结核分枝杆菌耐药菌株不断出现和传播, 给结核病的治疗和控制带来严峻的挑战。耐多药结核病已成为当前我国结核病防治工作面临的主要挑战之一^[3]。本院实验室是第五轮全球基金耐多药项目示范实验室, 常规采用比例法进行结核菌的耐药检测, 但它是以细菌生长终点判断结果, 由于结核分枝杆菌生长缓慢, 在得到分离培养物后仍需 4~6 周方能获得结果。耐多药结核病患者的诊断成为一个亟需解决的问题^[4]。现在先进的 DNA 微阵列技术能把结核菌的耐药检测缩短到 4 h, 它是快速检测结核分枝杆菌耐药基因的方法, 先通过不对称 PCR 技术扩增待测 TB 菌的 DNA 片段, 并标记上荧光分子, 扩增产物再与 DNA 芯片上探针杂交, 根据探针的特定排布获知待测菌对异烟肼 (INH)、利福平 (RFP) 的耐药性, 为结核分枝杆菌耐药检测开辟了一条新的途径。研究者通过这两种方法分别对结核分枝杆菌菌株进行检测, 来分析 DNA 微阵列芯片法的特点, 探讨其在结核分枝杆菌耐药检测中的可行性。

1 材料与方法

1.1 一般资料 随机抽取项目实验室 2012 年 1 月至 2013 年

3 月从临床标本中分离培养后所得的, 并通过 L-J、TCH、PNB 培养基进行初步鉴定的 54 株结核分枝杆菌。H37RV 即结核分枝杆菌 (ATCC27294), 由山东省胸科医院汉光国际感染疾病研究中心赠与。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 BioMixerTM II 芯片杂交仪、SlideWasherTM 8 芯片洗干仪、LuxScanTM 10K-B 芯片扫描仪、博日 Life Touch 基因扩增仪、GNP-9270 恒温箱。仪器设备: 培养基蒸汽凝固灭菌器, ZHN-4 型, 中国原子能科学研究院; 电子天平, FA1604 型, 上海舜宇恒平科学仪器公司, 精度达 1/10000 级。

1.2.2 试剂 (1) 微阵列法, 博奥微阵列芯片法结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒含 A 部分: SSC SDS TE, B 部分: PCR 扩增试剂 1、2、3, 杂交缓冲液, 阴阳性对照; 博奥公司产利福平耐药检测芯片、异烟肼耐药检测芯片。(2) 比例法, 标准麦氏比浊管, 抗结核药物纯品: 异烟肼 (INH)、利福平 (RFP) 纯粉均由国家结核病参比实验室提供, 纯度分别为: 99.6%、98.3%, 及对硝基苯甲酸 (PNB) 培养基、噻吩-2-羧酸 (TCH) 培养基、L-J 罗氏培养基。

1.3 方法

1.3.1 比例法 按照结核病诊断细菌学检验规程进行如下操作。

1.3.1.1 培养基制备 (1) 基础培养基: 中性罗氏培养基。

^{*} 基金项目: 山东省科技发展计划项目 (2006GG2202001)。 作者简介: 刘亚芹, 女, 主管技师, 主要从事分枝杆菌菌种鉴定、耐药检测的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: liang19961111@126.com。

(2)含药培养基:INH、RFP 溶解、稀释于基础培养基中分装 7 mL/管,斜置于培养基蒸汽凝固灭菌器内,85 ℃凝固 50 min。制成的培养基 37 ℃ 无菌试验 24 h,检查无污染,4 ℃避光保存,1 个月内使用。

1.3.1.2 药物敏感性试验 制备菌悬液,刮取菌龄 2~3 周的结核分枝杆菌菌落(刮取斜面各个部分培养物),放入玻璃磨菌器内研磨,以 0.5%吐温-80 生理盐水稀释,与标准麦氏比浊管比浊,配成 1 mg/mL 菌悬液。用 22 SWG 标准接种环取 2 满环 1 mg/mL 菌液,平移至 2 mL 灭菌生理盐水中,即成 10⁻² mg/mL 菌液,再以同法稀释成 10⁻⁴ mg/mL 菌液,用 22SWG 标准环分别取 1 满环 10⁻² mg/mL 和 10⁻⁴ mg/mL 菌液,用划线法均匀接种至含药培养基和对照培养基斜面上,37 ℃培养 4 周后报告结果。若耐药百分比大于 1%,则判耐药。耐药百分比=含药培养基的菌落数/对照培养基的菌落数×100%。

1.3.2 DNA 微阵列法

1.3.2.1 DNA 提取 将 54 个菌株分别挑一个菌落加入含 80 μL 提取液的管中快速振荡 5 min,再置于 95 ℃水浴锅中,加热 5 min,5 000 r/min 离心 1 min。

1.3.2.2 PCR 扩增 把 PCR 扩增试剂 1、2、3 各 18 μL 分别放入 3 管,将核酸提取物 2 μL 依次加入到 3 个管中,每个样品进行 3 管 PCR 扩增。离心后放基因扩增仪按 37 ℃ 600 s 1 个循环,94 ℃ 600 s,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s 35 个循环,94 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s 10 个循环,72 ℃ 420 s 进行扩增,分别得到 PCR 产物 1、2、3。

表 1 RFP 芯片上的探针(相关 rpoB 基因)排布

511 WT(CTG)	511(CTG→CCG)
513 WT(CAA)	513(CAA→AAA)
516 WT(GAC)	513(CAA→CCA)
533 WT(CTG)	533(CTG→CCG)
531 WT(TCG)	531(TCG→TTG)
526 WT(CAC)	531(TCG→TGG)
526(CAC→TAC)	526(CAC→GAC)
526(CAC→CTC)	526(CAC→CGC)
516(GAC→GTC)	516(GAC→TAC)
516(GAC→GGC)	NC

NC:阴性对照探针;WT:野生型。

1.3.2.3 芯片杂交 PCR 产物 95 ℃ 5 min,放冰水 5 min。按照 9 μL 杂交缓冲液,3 μLPCR 产物 1、3 μLPCR 产物 2 配制杂交混合物 R;9 μL 杂交缓冲液,3 μL PCR 产物 1、3 μL PCR 产物 3 配制杂交混合物 H。吸取 13.5 μL 杂交混合物经加样孔加入芯片点阵中,微阵列 1 加入杂交混合物 R,微阵列 2 加入杂交混合物 H,在芯片杂交仪中 50 ℃杂交 2 h,转速为 5 r/min。使用 SideWasherTM 8 芯片洗干仪清洗芯片,使用晶芯 LuxScan™10K-B 微阵列芯片扫描仪和晶芯 分枝杆菌药敏检测分析系统进行信号的读取及结果判断。

1.3.2.4 DNA 阵列排布及结果判读说明 PCR 产物 1 为对照产物,与微阵列 1、2 都杂交,PCR 产物 2 为 rpoB 基因的扩增产物,与 RFP 耐药检测芯片进行杂交,PCR 产物 3 为 katG 基因及 inhA 基因启动子的扩增产物,与 INH 耐药检测芯片进行杂交。RFP 芯片上的探针(相关 rpoB 基因)排布如表 1 所示。INH 芯片上的探针(相关 katG 基因及 inhA 基因启动子)排布

如下表 2 所示。

在结核分枝杆菌经过 DNA 提取,PCR 扩增,分别和 RFP、INH 耐药检测芯片进行杂交后,如果此菌 DNA 中有如表 1 所示的 rpoB 基因的突变位点,那么 RFP 的耐药检测芯片在放入芯片扫描仪时,该位点的扫描信号就会强于芯片上的其他点。扫描仪的信号分析系统为 Luxscan3.0 软件,它的功能是获取芯片上信号值最大的探针,若最大的探针为突变探针,则判读为突变型,对 RFP 耐药。若此菌无 rpoB 基因的突变位点,信号最大的探针为野生探针,则判读为野生型,对 RFP 敏感。同样,INH 的耐药检测芯片在放入扫描仪后,扫描系统也会根据信号大小进行此菌对 INH 的耐药性判读。

1.4 统计学处理 应用 SPSS9.0 软件进行数据处理,对两种方法在结核分枝杆菌耐药检测中的比较采用四格表资料的 χ^2 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

表 2 INH 芯片上的探针(相关 katG 基因及 inhA 基因启动子)排布

katG IC	InhA IC
katG 315 WT(AGC)	InhA-15WT(C)
katG 315(AGC→ACC)	InhA-15(C→T)
katG 315(AGC→AAC)	NC

NC:阴性对照探针;WT:野生型。

2 结 果

2.1 比例法结果 54 株临床分离株,比例法的结果是 17 株对两种药物全部敏感,15 株只对 INH 耐药,13 株只对 RFP 耐药,同时耐 INH 和 RFP 的 9 株,并附加做质控菌株 H37Rv 显示在控。

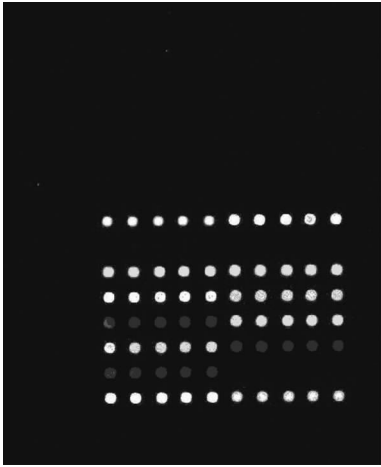


图 1 结核菌 katG 基因 315(AGC→ACC)图

2.2 DNA 微阵列法的结果、并与比例法药敏结果比较 DNA 微阵列法的结果是,24 株比例法检出为 INH 耐药株(含 9 株同时耐 INH 和 RFP 的菌株)中,18 株检出突变,与比例法的符合率为 75.0%,katG 315(AGC→ACC)突变株最多 13 株如图 1 所示,3 株 katG 315(AGC→AAC)突变,2 株 InhA-15(C→T)如图 2 所示。22 株比例法检出为 RFP 耐药株(含 9 株同时耐 INH 和 RFP 的菌株)中,20 株检出突变,与比例法的符合率为 91.0%,531(TCG→TTG)如图 3 所示检出最多 13 株,531 位突变占 65.0%,526(CAC→TAC) 1 株如图 4 所示,526(CAC→CTC) 1 株,526(CAC→GAC) 1 株,526 位突变占 15.0%,516(GAC→TAC) 1 株,516(GAC→GTC) 1 株,533(CTG→CCG) 1 株,513(CAA→AAA) 1 株。17 株比例法检出

为 INH(katG 和 InhA 基因均野生型,图 5 所示)敏感和 RFP (rpoB 基因野生型,图 6 所示)敏感的菌株,其微阵列法探针检测结果也为 INH、RFP 全部敏感。

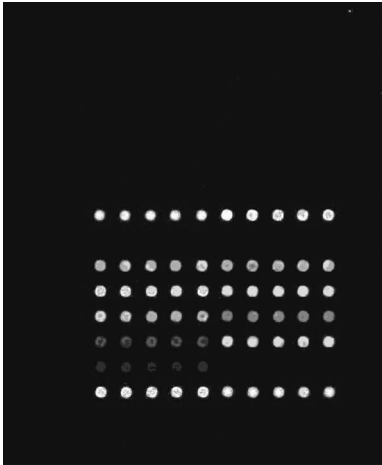


图 2 结核菌 InhA 基因-15(C→T)图

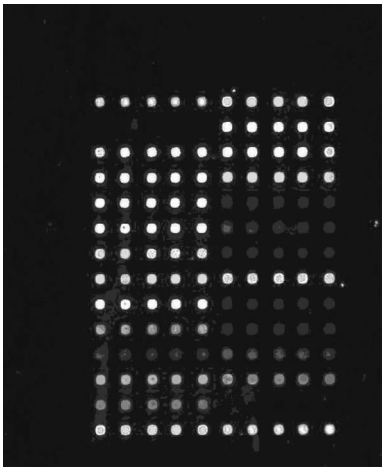


图 3 结核菌 rpoB 基因 531(TCG→TTG)图

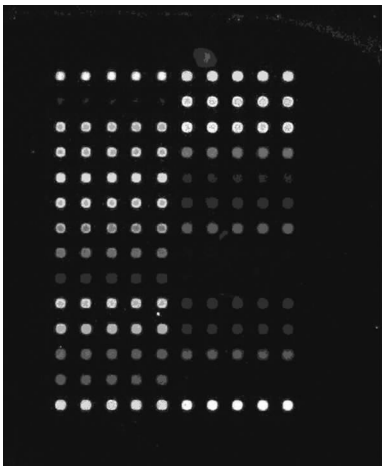


图 4 结核菌 rpoB 基因 526(CAC→TAC)图

DNA 微阵列法与比例法对 INH 耐药性检测的结果比较如下表 3 所示,两种方法在结核菌对 INH 耐药性检测中的差异无统计学意义($\chi^2=4.17, P>0.05$)。

对 RFP 耐药性检测结果的比较如下表 4 所示,两种方法在结核菌对 RFP 耐药性检测中的差异也无统计学意义($\chi^2=0.5, P>0.05$)。

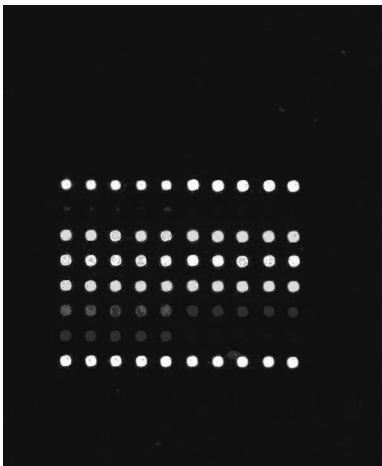


图 5 结核菌 katG 和 InhA 基因均野生型图

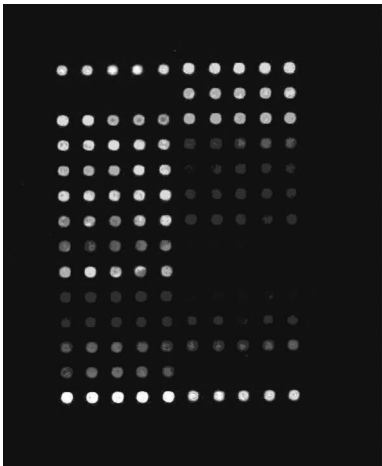


图 6 结核菌 rpoB 基因野生型图

表 3 DNA 微阵列法与比例法对 INH 耐药性检测的结果比较

比例法	DNA 微阵列		
	耐药	敏感	合计
耐药	18	6	24
敏感	0	30	30
合计	18	36	54

表 4 DNA 微阵列法与比例法对 RFP 耐药性检测的结果比较

比例法	DNA 微阵列		
	耐药	敏感	合计
耐药	20	2	22
敏感	0	32	32
合计	20	34	54

3 讨 论

结核分枝杆菌生长缓慢,分裂一代约需 15~20 h,传统比例法药敏试验成熟可靠,但需要时间为 1 个月,时间长满足不了临床需要,而 DNA 微阵列芯片技术全程只用 4 h,它可以直接应用于痰及其他临床标本的检测^[5],通过检测 RFP 耐药相关基因 rpoB、INH 的耐药基因 KatG、inhA 基因启动子的野生型及突变型来判断是否耐药。因这些区域是 RFP、INH 耐药检测的主要靶位^[6]。在 RFP 耐药菌株中 95% 以上是由于

rpoB 基因突变所致^[7], rpoB 基因突变导致 RFP 不能与细菌 RNA 聚合酶 β 亚单位结合, 而出现耐药^[8], rpoB 基因 DNA 微阵列检测 6 个位点、13 个突变型。KatG 基因突变引起过氧化氢酶活性降低, 导致 INH 耐药, inhA 基因突变使 NADH 酶失去了和 NADH 的亲合力, 导致 INH 耐药^[9], KatG 基因、inhA 基因 DNA 微阵列各检测 1 个位点, 分别为 KatG 的 315 位两个突变型, inhA 基因启动子 1 个突变型。DNA 微阵列技术就是一种建立于 PCR 基础上结合高特异性的 DNA 探针来检测上述位点及突变的杂交方法。试验中 DNA 微阵列法对 RFP 的检测结果与比例法的药敏结果复合较好, 灵敏度是 91.0%, 特异性是 100%, 对 INH 的灵敏度是 75.0%, 特异性是 100%, 说明 ropB、katG、inhA 基因作为结核分枝杆菌耐药性快速诊断标志具有很好的代表性。并且 rpoB 的位点突变中, 531、526、516 位的突变最为常见, 微阵列法包含了上述位点及突变, 所以检测 RFP 有较好的敏感性。在对 INH 的检测中, 有 6 株 INH 比例法耐药的菌株, 基因微阵列法未检出, 原因可能是除 KatG、inhA 外, KaSA 和 ahpc 基因也与 INH 的耐药有一定的关系, ahpc 基因突变可导致 ahpc 表达增强, 它的过量表达可以补偿因 KatG 基因突变的损失, 一般将 ahpc 基因作为 KatG 基因损伤的标志。KatG 基因突变除 315 位, 463 位还可见 104Arg, 108His 等密码子突变, 不过也有学者认为 KatG463 密码子是一个多态性位点, 因此其突变与 INH 耐药关系不大。芯片设计中对 INH 的突变检测 KatG 基因只设计了 315 位, 是否因突变位点检测的缺失还有待进一步的检测分析。另外, 尽管分子生物学类技术如 DNA 微阵列有很多优势, 但样本中结核分枝杆菌数目较少或者样本中存在抑制 DNA 扩增的物质等, 也有可能造成假阴性^[10]。

综合看来, DNA 微阵列技术具有快速、灵敏度好、特异性高的特点, 可作为临床快速检测结核分枝杆菌耐药株的筛选试验, 尤其是在耐多药结核病的筛选中具有重要价值。可以为临床诊断、选择和调整耐药结核病的治疗方案提供参考, 在积极应对结核尤其是耐多药结核病, 遏制结核的传播, 降低结核病

的病死率方面有重要意义。

参考文献

- [1] Lnnroth K, Castro KG, Chakaya JM, et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development[J]. Lancet, 2010, 375(9728): 1814-1829.
- [2] World Health Organization. WHO Report: Global Tuberculosis Control 2012[S]. 2012.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [4] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralized use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study[J]. Lancet, 2011, 377(9776): 1495-1505.
- [5] Guo Y, Zhou Y, Wang C, et al. Rapid, accurate determination of multidrug resistance in M. tuberculosis isolates and sputum using a biochip system[J]. Int J Tuberc lung Dis, 2009, 13(7): 914-920.
- [6] Chaoui I, Sabouni R, Kourout M, et al. Analysis of isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from Morocco[J]. J infect Dev Ctries, 2009 3(4): 278-284.
- [7] Pham M, Lemberg DA, Day AS. Probiotics: sorting the evidence from the Myths[J]. Med J Aust, 2008, 188(5): 304-308.
- [8] Science Direct. Rifampin[J]. Tuberculosis, 2008, 88: 151-154.
- [9] Luckner SR, Liu N, am Ende CW, et al. A slow, tight binding inhibitor of InhA, the enoyl-acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis[J]. J Biol Chem, 2010, 285(19): 14330-14337.
- [10] 张太松, 李明. 分子诊断技术在耐多药结核分枝杆菌检测中的应用进展[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(2): 129-134.

(收稿日期: 2014-02-08)

(上接第 1909 页)

求比 FS 的要求更高。但是 LoQ 的确定要求使用低浓度的定值样品, 这样才能估计偏差的大小, 而常规实验室中很难得到定值样品。本研究中 PA 为多点校准, 正好有低浓度的定值校准品 35 mg/L, 但是其计算的 TE 为 12.12 mg/L, 不满足本实验室的要求(25%, 358.75 mg/L), 所以应用浓度稍高的样品确定 LoQ。在测定 FS 时, 将高值标本和低值标本按一定比例混合, 多次测量取均值作为该浓度的标示值, 实验没有考虑稀释效应以及标示值与可接受真值的偏差。本研究中浓度差距稍大, 所以暂定 FS 为 25 mg/L, 其 CV 值为 15.41%, 如果采用 CV 值和浓度线性回归的方法, CV 为 20% 时 FS 为 20.20 mg/L。

临床检测 PA 时, 低于 16.35 mg/L 的应报告“未检出; 浓度小于 25 mg/L”; 浓度介于 16.35 mg/L~25 mg/L 的应报告“检出, 但不能定量; 浓度大于 25mg/L”; 浓度大于 25 mg/L 的则直接报告检测值。

参考文献

- [1] Obhons A, Roong C, Nantimj K, et al. Impact of liver cirrhosis On nutritional and immunological 8181118[J]. Med Assco Thai, 2001, 84(7): 982-988.

- [2] Rondana M, Milani L, Merkel C, et al. Value of prealbumin plasma levels as liver test[J]. Digestion, 1987, 37(2): 72-78.
- [3] 李继恩. 900 例肝病患者血清前清蛋白的临床意义[J]. 中国全科医学, 2010, 13(1): 14-15.
- [4] 廖严, 何长有, 肖有书. 不同肝病患者血清前清蛋白和清蛋白的检测及意义[J]. 山东医药, 2008, 48(14): 116-117.
- [5] 陈宏伟, 李延伟, 范银忠. 肝病患者血清前清蛋白测定的临床意义[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(6): 1348-1349.
- [6] 高泽立, 许洁, 王功大, 等. 肝病患者血清前清蛋白测定的临床意义[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2006, 15(1): 69-70.
- [7] 朱建一, 闻平. 血清胆碱酯酶和前清蛋白对肝脏合成功能监测的意义[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(6): 458.
- [8] 黄燕华, 张秀明, 王伟佳, 等. 电化学发光免疫法检测降钙素原的空白限检出限和功能灵敏度的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(20): 2539-2541.
- [9] 韩雪晶, 唐红霞, 甄利, 等. 高敏感方法检测心肌肌钙蛋白 I 的检测限和功能灵敏度的建立及评价[J]. 检验医学, 2013, 28(2): 97-101.
- [10] 柯培锋, 韦僑雯, 欧财文, 等. 化学发光法检测 TSH 可报告低值结果的选择与评价[J]. 检验医学, 2010, 25(2): 139-141.

(收稿日期: 2014-02-14)