

· 论 著 ·

基因芯片法检测结核分枝杆菌耐药性的可行性分析*

胡晓红, 向启云, 庄倩, 李沫, 董艳娥
(宜昌市第三人民医院检验科, 湖北宜昌 443003)

摘要:目的 分析基因芯片法检测结核分枝杆菌(MTB)耐药性的灵敏度、特异度及符合率,为临床提供方便、准确、快速的 MTB 耐药性的检测方法。方法 以 DNA 测序法为金标准,采用基因芯片法与比例法药敏试验同时对 2014 年 8~12 月收治的 250 例结核患者的痰液标本分离 MTB 菌株进行耐药性检测,比较两种方法检测 MTB 对利福平和异烟肼耐药性的效能。结果 基因芯片法与比例法药敏试验检测 MTB 对利福平的耐药率分别为 3.0%、3.5%,对异烟肼的耐药率分别为 6.7%、8.2%。以 DNA 测序法为金标准,基因芯片法检测 MTB 对利福平与异烟肼耐药性的灵敏度、特异度及符合率均高于比例法药敏试验,且检测时间短于比例法药敏试验,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 运用基因芯片法检测 MTB 对利福平和异烟肼的耐药性,具有较高的灵敏度、特异度与符合率,可以代替比例法药敏试验成为检测 MTB 耐药性的有效方法。

关键词:基因芯片法; 比例法药敏试验; DNA 测序法; 灵敏度; 特异度; 符合率
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.024 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)23-3421-03

Analysis on the feasibility of genechip method in detecting Mycobacterium tuberculosis drug resistance*

Hu Xiaohong, Xiang Qiyun, Zhuang Qian, Li Mo, Dong Yan'e

(Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Yichang City, Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: **Objective** To analyse the sensitivity, specificity and coincidence rate of genechip method in the detection of resistance to antibacterial agents in Mycobacterium tuberculosis(MTB), in order to provide a convenient, accurate and rapid method for detecting antibacterial resistance in MTB. **Methods** The DNA sequencing was taken as gold standard, and antibacterial resistance of the strains of MTB isolated from sputum specimens of 250 cases of patients with tuberculosis from August to December 2014 were detected by using the genechip method and proportion method for susceptibility testing at the same time. Efficacies of the two methods in detecting MTB resistance to rifampin and isoniazid were compared. **Results** The MTB resistance rate to rifampin detected by using the genechip method and proportion method for susceptibility testing was 3.0% and 3.5% respectively; that to isoniazid was 6.7% and 8.2% respectively. For detecting MTB resistance to rifampin and isoniazid, the DNA sequencing was taken as gold standard, the sensitivity, specificity and coincidence rate of genechip method was higher than those of proportion method for susceptibility testing, and the test time of genechip method was shorter than that of proportion method for susceptibility testing, there were statistically significant differences($P<0.05$). **Conclusion** Using the genechip method to detecting MTB resistance to rifampin and isoniazid has high sensitivity, specificity and coincidence rate, which could replace the proportion method for susceptibility testing and become an effective method.

Key words: genechip method; proportion method for susceptibility testing; DNA sequencing; sensitivity; specificity; coincidence rate

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)感染所致的一种严重的传染病,主要侵犯人体肺脏,又称为“痨病”或“白色瘟疫”^[1]。随着环境的恶化、MTB 耐药菌株的出现,以及流动人口的增加,全球结核病疫情急剧恶化。根据世界卫生组织调查显示,全球约有 1/3 的人口感染了 MTB,每年约有 900 万新发结核病患者,约 300 万人死于结核病,这严重威胁到人们的健康^[2]。随着耐药 MTB 菌株特别是耐多药 MTB 菌株的出现,结核病的控制与治疗更加严峻。因此,探寻一种方便、准确、快速的检测 MTB 耐药性的方法,为耐多药结核病的预防、诊断及治疗提供准确的依据,具有重要的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2014 年 8~12 月本院收治的 250 例涂阳结核病患者为研究对象。所有患者于清晨采集 3 份痰液,每份 3 mL,搜集到指定容器内,储存在 4~8 ℃ 的冰箱内,并及时送

检。3 份标本分别作为基因芯片法、比例法药敏试验与 DNA 测序法检测的标本。

1.2 仪器与试剂 120020 晶芯® ExtractorTM36 核酸快速提取仪(北京博奥生物有限公司),BYQ6931-211 基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),MTB 耐药基因检测试剂盒、芯片杂交仪及洗干仪、芯片阵列扫描仪(北京博奥生物有限公司提供),罗氏培养管(珠海贝索生物技术有限公司),细菌培养箱(上海一恒科学仪器有限公司生产)等。

1.3 方法

1.3.1 基因芯片法^[3] 该方法分为样品制备、芯片反应与洗干及结果判读 3 个部分,所有步骤均按照仪器与试剂说明书严格操作:(1)样品制备:将经消化液处理好的样品放入核酸提取仪进行核酸提取,并将提取到的核酸放入基因扩增仪中扩增;(2)芯片反应与洗干:将得到的基因扩增产物放入相应的试剂

* 基金项目:湖北省宜昌市卫生科技项目(No. A15301-38)。 作者简介:胡晓红,女,主管技师,主要从事临床分子生物学检验工作与研究。

盒中进行芯片反应,并将完成的杂交芯片放入芯片洗干仪中洗干;(3)结果判读:将洗干的芯片放到芯片扫描仪中,进行 *rpoB*、*katG* 与 *inhA* 等基因耐药性的结果判读。

1.3.2 比例法药敏试验 从已培养出菌落的培养基上取 1 接种环菌落,与标准麦氏管对比制成菌悬液,分别接种于含有利福平和异烟肼的药敏试验培养基中,在 37℃ 培养 6 周,观察试验结果。

1.3.3 DNA 测序法 从改良罗氏培养基上取 1 接种环的 MTB 接种于 10 mL 的 Middlebrook 7H9 培养基内,37℃ 培养 4 周。严格按照文献[4]的 DNA 测序法对 *rpoB*、*katG* 与 *inhA* 等基因进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行数据处理与统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 *t* 检验进行比较分析,计数资料以例数或百分率表示,并采用 χ^2 检验进行比较分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 痰涂片检测结果 调查的 250 例涂阳结核病患者中 10 例为非结核杆菌感染,13 例缺乏完整的利福平检测结果,32 例缺乏完整的异烟肼检测结果。因此,共 227 份利福平检测结果与 208 份异烟肼检测结果纳入统计分析。

2.2 基因芯片法与比例法药敏试验检测 MTB 耐药性的结果分析 基因芯片法检出利福平耐药 MTB 菌株 7 株,比例法药敏试验检出利福平耐药 MTB 菌株 8 株,耐药率分别为 3.0% (7/227)、3.5% (8/227);基因芯片法检出异烟肼耐药 MTB 菌株 14 株,比例法药敏试验检出异烟肼耐药 MTB 菌株 17 株,耐药率分别为 6.7% (14/208)、8.2% (17/208)。

2.3 3 种方法法检测利福平药物敏感性的检测效能比较 以 DNA 测序法为检测金标准,基因芯片法检测利福平耐药的灵敏度、特异度及符合率均高于比例法药敏试验,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

检测方法	药物 敏感性	DNA 测序法		灵敏度 (%)	特异度 (%)	符合率 (%)
		耐药(<i>n</i>)	敏感(<i>n</i>)			
基因芯片法	耐药	90	8	90.1	93.8	92.5
	敏感	9	120			
比例法药敏试验	耐药	78	46	78.8	64.1	70.5
	敏感	21	82			
<i>t</i>	—	—	—	6.456	5.984	6.324
<i>P</i>	—	—	—	<0.05	<0.05	<0.05

—:无数据。

2.4 3 种方法检测异烟肼药物敏感性的检测效能比较 以 DNA 测序法为检测金标准,基因芯片法检测异烟肼耐药的灵敏度、特异度及符合率均高于比例法药敏试验,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

检测方法	药物 敏感性	DNA 测序法		灵敏度 (%)	特异度 (%)	符合率 (%)
		耐药(<i>n</i>)	敏感(<i>n</i>)			
基因芯片法	耐药	83	7	91.2	94.0	92.7
	敏感	8	110			

检测方法	药物 敏感性	DNA 测序法		灵敏度 (%)	特异度 (%)	符合率 (%)
		耐药(<i>n</i>)	敏感(<i>n</i>)			
比例法药敏试验	耐药	65	35	71.4	70.1	70.7
	敏感	26	82			
χ^2	—	—	—	6.546	5.995	6.121
<i>P</i>	—	—	—	<0.05	<0.05	<0.05

—:无数据。

2.5 基因芯片与比例法药敏试验检测时间比较 基因芯片法检测 MTB 耐药性的时间为 (24.5 ± 2.2) h,比例法药敏试验检测时间为 (6.1 ± 0.3) 周,差异有统计学意义 ($t = 6.849$, $P < 0.05$),基因芯片法检测时间较比例法药敏试验明显缩短。

3 讨 论

由 MTB 引起的结核病至今仍是世界上最常见的人类传染病之一,已经成为传染病的头号死亡杀手。我国结核病流行一直十分严重,据 2000 年第 4 次全国结核病流行病学抽样调查估计,我国现有 MTB 感染者约 5.5 亿,活动性肺结核患者约 451 万,其中传染性肺结核患者 196 万,每年因结核病死亡人数约 13 万,严重影响了患者的生活健康。随着耐药结核患者的增多,结核病的治疗与控制面临着更加严峻的形势。因此,探索一种检测 MTB 耐药性的方法具有重要的临床意义。

目前,检测 MTB 耐药性的方法有常规药物敏感性试验、DNA 测序法、聚合酶链式反应-单链构象多态性分析及基因芯片法等[5]。虽然临床常采用常规药物敏感性试验检测菌株是否具有耐药性,但是该方法对耐药菌株尤其是 MTB 的检出率很低,而且药敏结果的获得需要 2 个月甚至更长的时间,无法满足临床辅助诊断与指导用药的需要,限制了其在临床上的使用[6]。DNA 测序法是目前基因水平检测 MTB 耐药基因突变最可靠的方法,具有操作简便、快捷的特点,并可用于突变耐药株的筛选,而且能准确判定碱基突变的部位与性质,被公认为耐药相关突变分子生物学检测技术的金标准[7]。有研究报道,基因芯片法对检测 MTB 是否耐药具有较高的灵敏度与特异度[8]。基因芯片技术是近年来引进的检测生物多样性的方法,其基本原理是将多种探针固定在基质上,然后使目标 DNA 或 RNA 与探针杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息[9]。由于该检测方法可一次性同时检测大量探针,从而解决了其他检测方法效率低的问题。本文采用基因芯片法检测 MTB 的 *rpoB*、*katG* 与 *inhA* 等基因的耐药性发现,以 DNA 测序法为标准,基因芯片法检测 MTB 对利福平的灵敏度、特异度及符合率分别为 90.1%、93.8% 与 92.5%,在检测对异烟肼的耐药性时,基因芯片法的灵敏度、特异度及符合率分别为 91.2%、94.0% 与 92.7%,均明显高于比例法药敏试验。比例法药敏试验的灵敏度、特异度及符合率较低的原因,可能与试验过程中控制条件不良有关[10]。更为重要的是,基因芯片法所用的时间为 (24.5 ± 2.2) h,明显短于比例法药敏试验,节省了检测时间,能够快速为临床提供相关数据。

综上所述,基因芯片技术检测 MTB 对利福平和异烟肼的耐药性,具有较高的灵敏度、特异度与符合率,可以代替比例法药敏试验成为检测 MTB 耐药性的有效方法。 (下转第 3425 页)

的差异,此时,为作出正确判断,可对试验结果进行分析,试着舍弃某组数据后重新进行统计分析;如果缩小分析范围后回归式有明显改善,即 b_1 近于 1、 b_0 近于 0,则认为缩小的分析范围即为真实的线性范围。本次试验 CK 的分析即出现了上述现象,当舍弃了最后两点,截距由 4.979 4 降低到 0.660 8,评价为线性,则 CK 的线性范围为 1~9 号样品的测定浓度。

卫生行业标准法和 EP6-A 法都是采用多项式回归分析。前者提供了离群值的剔除方法,而且数据的不精密度计算比较简单,具有可操作性;但当数据组为非线性,进行临床标准的线性与非线性检验时,未提供样品数与重复测定次数的积($L \times R$)大于 20 时的不精密度及最优拟合曲线与直线的平均差异值(ADL)的临界值,因此就不能判断该非线性是否为临床可接受,则在以建立某测定项目线性范围为目的、样品浓度水平较多的试验中运用受限。运用 EP6-A 法进行线性评价时,如果最适模型为一次多项式时,直接判断为线性(线性 1),当呈现非线性关系时,则通过计算每个样品浓度水平处的 DL,运用“差值图”直观地显示非线性大小,且能明确显示线性程度及非线性的位置。EP6-A 认为如果二次多项式模型的非线性系数 b_2 或三次多项式模型的 b_2 和 b_3 中任一个与 0 比较差异有统计学意义时,则该组数据存在非线性;此时,只是非线性被检测到,仅仅是统计学上的显著性,但不代表对患者测量结果的影响程度。因此,当非线性是统计学上的非线性,且引入的误差不得超过临床允许误差时,称为临床可接受线性(线性 2)。

观察 CK、Urea 的线性分析结果可见:改良 Doumas 法评价 Urea 为线性、CK 在缩小分析范围(舍弃第 10、11 号)后为线性;而卫生行业标准法和 EP6-A 法评价为非线性,卫生行业标准法因本身的缺陷为不能判断非线性是否为临床可接受,EP6-A 法的 CK 在舍弃最高值后评价为线性(线性 1),Urea 评价为临床可接受线性(线性 2)。在进行临床生物化学测量项目的线性范围评价时,极值(即最高值和最低值)的测量值易超出线性范围,因此对 Urea 尝试逐步舍弃极值后再进行多项式回归分析,舍弃最低值仍然判断为非线性;舍去最高值后判断

为线性。

综上所述,改良 Doumas 法不能准确地判断临界点是否真的在线性范围内,且所得线性范围较 EP6-A 法窄,因此,运用 EP6-A 法进行线性范围的评价更具有临床实用性。

参考文献

- [1] 于泳,薛玲.定量测定体外诊断试剂的线性评估方案及数学操作程序的研究—体外诊断试剂产品的系列研究(五)[J].首都医药,2011,18(8):11-12.
- [2] 潘锡龙.肌酸激酶活性检测的分析测量范围建立与评价[J].检验医学与临床,2013,10(2):167-168.
- [3] 吕赛平,刘琴,邹学森.应用 EP6-A2 方法验证血糖试剂盒的线性范围[J].实验与检验医学,2011,29(1):45-46.
- [4] 陈斌鸿,罗恒,李炜焯,等.奥林巴斯 AU5400 全自动生化分析仪检测尿素氮临床可报告范围的建立与评价[J].实验与检验医学,2011,29(2):117-120.
- [5] Jhang JS,Chang CC,Fink DJ. Evaluation of linearity in the clinical laboratory[J]. Arch Pathol Lab Med,2004,128(10):44-48.
- [6] 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].上海:上海科学技术文献出版社,2007:138-177.
- [7] 中华人民共和国卫生部. WS/T408-2012 临床化学设备线性评价指南[S].北京:中国标准出版社,2012.
- [8] 汪静.对检测系统分析性能的评估—《临床化学设备线性评价指南》标准解读[J].中国卫生标准管理,2013,4(1):14-16.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures;a statistical approach[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2003:1-60.
- [10] 王淑媛,柯培峰,司徒瑞儒,等.生化检验线性评价与应用[J].中国医疗设备,2011,26(2):96-104.
- [11] 黄志宏,付文金,汤慧华,等.多项式线性评价在自建生化检测系统中的初步应用[J].检验医学与临床,2012,9(1):93-96.

(收稿日期:2015-06-28)

(上接第 3422 页)

参考文献

- [1] 梁银志.肺结核初治患者心理状况分析与心理护理干预[J].内科,2013,8(5):563-564.
- [2] 邵燕,宋红焕,李国莉,等.江苏省 2010 年结核病耐药流行病学调查[J].南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(2):282-285.
- [3] 康丽菲,朱桂云,李秀武,等.基因芯片技术检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药性的研究[J].河北医药,2012,34(16):2412-2414.
- [4] Mani C,Selvakumar N,Kumar V,等. DNA 测序、PCR-SSCP 和 phaB 间接药敏实验检测结核分枝杆菌利福平耐药性的比较[J].国际结核病与肺部疾病杂志:中文版,2003,9(4):125-132.
- [5] 戎奇吉,吕火祥,孙爱华.基因芯片快速检测结核分枝杆菌 katG 基因突变及其与异烟肼耐药相关性[J].中国人兽共患病学报,2011,27(3):233-237.

- [6] 李卫彬,李新旭,张彤群,等.基因芯片检测技术检测结核分枝杆菌异烟肼和利福平耐药的实际应用效果评价[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(16):4666-4670.
- [7] 张俊仙,吴雪琼,阳幼荣,等.应用基因芯片方法检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼的耐药性[J].中国防痨杂志,2011,33(10):680-685.
- [8] 陈兆云,蒋静,王家路,等.基因芯片技术在结核耐药基因检测中的应用[J].新疆医学,2012,42(11):55-59.
- [9] 罗一钧.基因芯片技术检测结核分枝杆菌耐药性的临床价值[J].中国当代医药,2014,21(2):123-124.
- [10] 欧维正,骆科文,王燕,等.基因芯片和比例法药物敏感性试验检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药性的比较研究[J].检验医学,2013,28(5):404-407.

(收稿日期:2015-07-27)