

论著·基础研究

Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究^{*}

孙 倩, 张 倩, 张治国

(北京市昌平区结核病防治所检验科, 北京 102200)

摘要:目的 探讨 Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌(MTB)耐药性的临床适用性。方法 对 2013—2015 年昌平区结核病防治所 479 株培养分离菌株进行 Genotype MTBDRplus 检测和比例法药敏试验, 并对结果进行分析比较。结果 479 株培养分离株中, 有 434 株两种检测方法均显示为 MTB, 对这 434 例 MTB 的分离株使用 Genotype MTBDRplus 检测进行分析, 其对利福平(RIF)耐药性的灵敏度和特异度分别为 96.55%(28/29)和 99.51%(403/405), 两种检测方法的符合率为 99.31%(431/434); 突变位点主要为 S531L; 对异烟肼(INH)耐药性的灵敏度和特异度的分别为 88.14%(52/59)和 94.93%(356/375), 两种检测方法的符合率为 94.01%(408/434), 突变位点主要为 C15T 和 S315T1。结论 Genotype MTBDRplus 检测能快速提供 RIF 和 INH 耐药结果, 是传统比例法药敏试验的有效补充。

关键词:结核分枝杆菌; Genotype MTBDRplus; 耐药; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.04.003

中图法分类号:R378.91+1/R446.5

文章编号:1673-4130(2018)04-0392-04

文献标识码:A

Apply of Genotype MTBDRplus on detecting the resistance of Mycobacterium tuberculosis^{*}

SUN Qian, ZHANG Qian, ZHANG Zhiguo

(Department of Clinical Laboratory, Tuberculosis Prevention and Control in Changping District, Beijing 102200, China)

Abstract: **Objective** To investigate the adaptability of Genotype MTBDRplus on detecting the resistance of Mycobacterium tuberculosis. **Methods** Analyze and compare the results of Proportional drug sensitivity test and Genotype MTBDRplus detection in 479 strains of Mycobacterium tuberculosis from Tuberculosis Prevention and Control in Changping District from 2013 to 2015. **Results** A total of 434 strains in the 479 strains were detected as Mycobacterium tuberculosis by both of the two tests. The sensitivity and specificity of Genotype MTBDRplus on detecting rifampicin(RIF) in the 434 stains of Mycobacterium tuberculosis were 96.55%(28/29) and 99.51%(403/405), the compliance rate of the two methods was 99.31%(431/434), and the mutation site was mainly S531L. The sensitivity and specificity of isoniazid(INH) were 88.14%(52/59) and 94.93%(356/375), the compliance rate of the two methods was 94.01%(408/434), and mutation sites were mainly C15T and S315T1. **Conclusion** Genotype MTBDRplus detection could provide the results of RIF and INH resistance, and it is an effective supplement to the traditional proportional drug sensitivity method.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; Genotype MTBDRplus; drug resistance; mutation

结核病是世界级的流行病, 对人类健康造成了很大的危害。近年来由于耐药结核, 尤其是耐多药结核(MDR)感染率的上升, 我国已被世界卫生组织(WHO)认定为 27 个 MDR 及广泛耐药结核(XDR-TB)的高负担国家之一, 我国结核病的诊断和治疗面临着更为严峻的考验。目前, 结核分枝杆菌(MTB)的耐药诊断方式仍以比例法药敏试验为主, 由于 MTB 生长较慢, 在培养分离出菌株后, 还需耗时 4~6 周才

能根据菌株在培养基上的生长情况判定结果, 所以, 临床急需能够快速、准确提供结果的药敏试验方法。Genotype MTBDRplus 检测是一种基于多重 PCR 和分子探针杂交技术, 根据杂交条带显色情况判断分离菌株基因 rpoB、inhA 和 katG 的突变情况, 进而判断分离菌株对利福平(RIF)和异烟肼(INH)的耐药情况。在有培养菌株情况下, 耗时小于 24 h。本研究使用比例法进行药敏试验, 对 2013—2015 年昌平区结

^{*} 基金项目: 十二五艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项项目(2015ZX10003003); 北京市昌平区卫生发展专项项目(2016-2-01)。

作者简介: 孙倩, 女, 技师, 主要从事结核病分子生物学研究。

本文引用格式: 孙倩, 张倩, 张治国. Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(4): 392-395.

核病防治所 479 株 MTB 分离菌株进行了对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)生长实验,以及 RIF、INH 耐药检测。同时,使用 Genotype MTBDR-plus 试剂盒对这些菌株进行了 rpoB(与 RIF 耐药相关)、inhA 和 katG(与 INH 耐药相关)基因突变检测,与比例法药敏结果进行对比研究,探讨 Genotype MTBDRplus 检测在临床应用中的优缺点。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取昌平区结核病防治所 2013—2015 年全年临床分离菌株,共 479 株,全部纳入实验。H37Rv(ATCC 27294)标准菌株由中国疾病预防控制中心提供。

1.2 仪器与试剂 比例法药敏培养基为珠海贝索生物技术有限公司生产的 MTB 药敏培养基。Genotype MTBDRplus 试剂盒和 HotStar Taq DNA 聚合酶(QIAGEN)均由法国生物梅里埃公司提供。

1.3 方法

1.3.1 比例法药敏试验 对纳入实验的全部菌株和标准菌株 H37Rv 进行 PNB 和 TCH 生长实验和比例法药敏检测^[1],记录 RIF 和 INH 的耐药情况^[2]。

1.3.2 Genotype MTBDRplus 检测 对全部纳入实验菌株和标准菌株 H37Rv 进行 Genotype MTBDR-plus 检测,操作和结果判断完全按照操作手册进行,记录被测菌株 rpoB 基因、katG 基因和 inhA 基因检测情况。所有操作根据 Genotype MTBDRplus 试剂盒说明书进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计分析,两种检测方法的结果一致性比较采用 Kappa 检验。Kappa>0.75,表示两者一致性好;Kappa<0.40,表示两者一致性较差。

2 结果

2.1 MTB 鉴定结果 对照菌株 H37Rv 药敏试验结果为 MTB,对 RIF 和 INH 全敏感。比例法药敏试验结果显示 479 株分离菌株中,MTB 复合群 452 株,非 MTB(NTM)27 株。同样以 H37Rv 为对照菌株,采用 Genotype MTBDRplus 检测比例法药敏试验得到的 452 株 MTB,其中 18 株 TUB 条带未显示,标记为 NTM,其余 434 株均有 TUB 条带,记录为 MTB;检测 27 株 NTM,其中 22 株 TUB 条带未显示,记录为 NTM,5 株有 TUB 条带显示,记录为 MTB。在 479 株 MTB 培养分离株中使用 Genotype MTBDRplus 检测鉴定 MTB 复合群的灵敏度和特异度分别为 96.01%(434/452)和 81.48%(22/27),总符合率为 95.20%(456/479),Kappa 值为 0.63,表明在鉴定 MTB 结果方面两者有较高的一致性。

2.2 MTB 耐药结果

2.2.1 RIF 及 INH 的耐药性结果比较 对 434 株两种方法检测均鉴定为 MTB 的菌株进行 RIF 和 INH 耐药性分析,其中,rpoB 基因突变标记为 RIF 耐药,

katG 基因和 inhA 基因突变均标记为 INH 耐药。以比例法药敏试验结果为对照,29 株 RIF 耐药株中,28 株被 Genotype MTBDRplus 检测为耐药,1 株为敏感;405 株敏感株中,403 株被检测为敏感,2 株为耐药;59 株 INH 耐药株中,52 株被检测为耐药,7 株被检测为敏感;375 株敏感株中 356 株被检测为敏感,19 株检测结果为耐药。使用 Genotype MTBDRplus 检测 RIF 耐药性的灵敏度和特异度分别为 96.55%(28/29)和 99.51%(403/405),两种方法的符合率为 99.31%(431/434);检测 INH 耐药性的灵敏度和特异度分别为 88.14%(52/59)和 94.93%(356/375),符合率为 94.01%(408/434)。Kappa 值分别为 0.95 和 0.77,均大于 0.75,说明在耐药检测方面两者有很高的一致性。具体结果见表 1。

表 1 Genotype MTBDRplus 与比例法药敏试验结果(n)

Genotype MTBDRplus	比例法			
	RIF(n=434)		INH(n=434)	
	耐药	敏感	耐药	敏感
耐药	28	2	52	19
敏感	1	403	7	356
小计	29	405	59	375

注:有 1 株 inhA 和 katG 基因同时突变的菌株

2.2.2 Genotype MTBDRplus 检测 INH 耐药结果 GenotypeMTBDRplus 检测 INH 耐药基因 katG 和 inhA 的突变结果见表 2。比例法药敏试验检测出 INH 耐药菌株共 59 株(有 1 株 inhA 和 katG 同时突变),其中 inhA 突变 33.90%(20/59),katG 突变 55.93%(33/59),未检测到 inhA 和 katG 突变 11.86%(7/59);比例法药敏试验检测出 INH 敏感株 375 株,其中 inhA 突变 5.07%(19/375),katG 突变 0(0/375),未检测到 inhA 和 katG 突变 94.93%(356/375)。inhA 突变菌株 39 株中,其中比例法药敏试验结果显示耐药率为 51.28%(20/39),敏感率为 48.72%(19/39);katG 突变 33 株,比例法药敏试验结果显示耐药率为 100.00%(33/33)。

表 2 INH 耐药基因 katG 和 inhA 突变统计(n)

Genotype MTBDRplus	比例法		
	耐药	敏感	合计
inhA 突变	20	19	39
katG 突变	33	0	33
无突变	7	356	363
合计	59	375	434

注:有 1 株 inhA 和 katG 基因同时突变的菌株

2.3 Genotype MTBDRplus 检测 3 种基因的突变频率 434 株 MTB 菌株统计,rpoB 基因突变共 30 株,频率最高的突变位点为 S531L(63.33%,19/30);INH 耐药菌株中,katG 基因突变共 33 株,突变频率最高位点为 S315T1(96.97%,32/33);inhA 基因突

变共 39 株,突变频率最高位点为 C15T(87.18%,34/39)。见表 3。

表 3 Genotype MTBDRplus 检测基因突变频率

基因	n	野生型探针	突变型探针	菌株 (n)	百分比 (%)
rpoB	30	WT8	MUT3(S531L)	19	63.33
		WT8	—	2	6.67
		WT7	MUT2A(H526Y)	3	10.00
		WT7	—	1	3.33
		WT3 WT4	MUT1(D516V)	1	3.33
		WT3 WT4	—	2	6.67
		WT2	—	2	6.67
katG	33	WT	MUT1(S315T1)	32	96.97
		WT	—	1	3.03
		WT1	MUT1(C15T)	34	87.18
inhA	39	—	MUT1(C15T)	2	5.13
		WT2	MUT3A(T8C)	2	5.13
		WT2	MUT3B(T8A)	1	2.56

注:—表示无突变

3 讨 论

传统的 MTB 分离培养、药敏试验,耗时长,工作量大,在药敏检测进行期间患者很可能已经在耐药诊断不明确的情况下使用了不合适的化疗方案。Genotype MTBDRplus 检测可以同时检测 rpoB、katG 和 inhA 3 种基因的突变情况,进而判断出 RIF 和 INH 的耐药情况,较传统药敏检测速度快,操作简便。

本研究结果显示,在 479 株分离菌株中,使用 Genotype MTBDRplus 检测鉴定 MTB 复合群的灵敏度和特异度分别为 96.01%、81.48%,总符合率为 95.20%,Kappa 值为 0.63,表明 Genotype MTBDRplus 检测可以比较好地区分 MTB 和非 MTB。

使用 Genotype MTBDRplus 对 434 株 MTB 进行检测,对 RIF 和 INH 耐药性检测的特异度分别为 99.51%、94.93%,灵敏度分别为 96.55%、88.14%,符合率分别为 99.31%、94.01%。Genotype MTBDRplus 对 RIF 耐药性的检测性能与菅记涌等^[3]及蒋云宇等^[4]报道相符。而 INH 耐药情况比较复杂,以往报道显示,以比例法药敏试验为对照,Genotype MTBDRplus 检测 INH 耐药情况的特异度为 60.7%~97.54%,灵敏度为 73.3%~89.56%^[4-8],本研究结果的特异度和灵敏度均在上述范围内。然而,国外报道显示,使用 Genotype MTBDRplus 方法对 RIF 和 INH 耐药性检测的灵敏度分别为大于或等于 97%,以及大于或等于 90%^[9],本研究及其他国内报道与之差异明显,可能是由于地区差异或者耐药菌株样本量大小所导致的差异。Genotype MTBDRplus 检测 RIF 和 INH 耐药情况与比例法药敏实验结果相比,Kappa 值分别为 0.95 和 0.77,均大于 0.75,说明使用 Genotype MTBDRplus 检测 RIF 和 INH 耐药情况与传统比例法药敏试验检测结果之间有较好的一致性,证明 Genotype MTBDRplus 检测能够很好地检

测 MTB 分离株对 RIF 和 INH 的耐药情况。

本研究中 Genotype MTBDRplus 检测 RIF 耐药性的灵敏度和特异度均高于 INH 耐药性,这与 MTB 耐 RIF 和耐 INH 两种药物的分子机制有一定的关系。有研究显示,MTB 对 RIF 耐药主要与 rpoB 基因的突变有关,可解释约 95%以上的 RIF 耐药突变^[10];而 MTB 对 INH 耐药主要与 katG、inhA、kasA、ndh、ahpC5 等多个基因突变或缺失等相关^[11],Genotype MTBDRplus 只检测 katG 和 inhA 两个基因的情况,有报道显示这两个基因只能解释约 80%以上的 INH 耐药株^[12],所以这也是导致 Genotype MTBDRplus 系统在检测 INH 耐药时特异度和灵敏度都较低的原因之一。

对 katG 和 inhA 基因突变频率进行分析后发现,同时具有 katG 和 inhA 突变的菌株仅 1 株。分析显示全部 katG 基因突变的菌株,在比例法药敏试验中均表现为 INH 耐药,而 inhA 突变则有 48.72%显示为 INH 敏感。对耐药基因突变位点进行分析发现,rpoB 基因突变以 S531L 突变为主(63.33%),与叶远馨等^[13]报道的 63.16%为 S531L 突变相符,高于菅记涌等^[3]报道的 55.21%为 S531L 突变。katG 突变以 S315T1 为主(96.97%,32/33),占全部 INH 耐药的 54.24%,这与已有报道也是相符的^[3]。inhA 突变以 C15T(87.18%)突变为主,inhA 突变菌株中有 19 株在比例法药敏试验中表现为敏感,20 株表现为耐药,占全部 INH 耐药的 33.90%。

以上研究结果提示,在 INH 耐药基因突变中,katG 基因的突变较 inhA 基因突变有更高的概率导致菌株的耐药性改变。同时也提示,除实验过程中存在的判读误差外,一些菌株耐药性的基因改变要早于表型改变,或者某些基因突变是无义突变,并不会造成耐药表型的改变,这些推论有赖于进一步的分子和表型的研究,才能得出更准确的结论。有 7 株未检测到 katG 或 inhA 基因突变,但表型为耐药株,占耐 INH 菌株的 11.86%(7/59),这 7 株中可能是其他耐 INH 相关基因突变所导致的耐药,这与文献^[12]报道的低于 20%的 INH 耐药株是由其他基因突变引起的结论相一致。

本研究使用的 479 株分离菌株,18 株经 Genotype MTBDRplus 检测鉴定为 NTM,比例法药敏试验检测为 MTB,原因可能是由于部分 NTM 会对 PNB 敏感^[14]。而有 5 株经 Genotype MTBDRplus 检测鉴定为 MTB,而比例法检测为 NTM,这有可能是由于实验室污染等原因造成的,但需要进一步的测序和重复试验进行确认。

综上所述,Genotype MTBDRplus 检测的 RIF 和 INH 耐药结果与传统的比例法药敏试验检测结果有较高的一致性,对于 INH 敏感或耐药的结果判断应结合其他诊断标准进行综合判断。鉴于 Genotype

MTBDRplus 检测速度快,可同时进行 MTB 鉴定和 RIF、INH 耐药鉴定,可以为临床提供更为快速、有效的诊断依据,对传统比例法药敏试验进行了一定的补充。

参考文献

- [1] WU X, YANG Y, HAN Y, et al. Effect of recombinant Rv1009 protein on promoting the growth of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Applied Microbiol, 2008, 105(4): 1121-1127
- [2] 张立兴,屠德华,端木宏谨,等. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006.
- [3] 菅记涌,王嫩寒,易俊莉,等. Genotype MTBDRplus 方法快速检测北京地区临床结核分枝杆菌分离株利福平和异烟肼耐药性效果评价[J]. 中国防痨杂志,2010,61(10): 189-192.
- [4] 蒋云宇,张德坤,缪昌东. HAIN 技术快速检测耐药结核病及耐多药结核病效果评价[J]. 江苏预防医学,2017,28(1):103-104.
- [5] 欧维正,厉宁,蒙俊,等. Hain 和基因芯片技术在结核分枝杆菌异烟肼耐药性检测中的应用评价[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(12):1062-1065.
- [6] 陈琛. Hain Test 法用于脊柱结核诊断的实验研究[D]. 太原:山西医科大学,2016.
- [7] 梁佳元,杨立军,刘敏,等. Hain 和 Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌药物灵敏度的检测[J]. 中国热带医学,

2017,17(3):263-265.

- [8] 刘亚芹,杨振斌,冯冬霞. HAIN 用于检测原发性耐药结核的研究[J]. 中国实验诊断学,2014,18(8):1266-1269.
- [9] FREDDIE B,SVEN H,MELLES H,et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis:a meta-analysis[J]. BMC Infect Dis,2009,9:67-82.
- [10] PHAM M, LEMBERG D A, DAY A S. Probiotics: sorting the evidence from the Myths[J]. Med J Aust,2008, 188(5):304.
- [11] DOUSTDAR F, KHOSRAVI A D, FARNIA P, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from iran [J]. Microb Drug Resist,2008,14(4):273-279.
- [12] JIAO W W, MOKROUSOV I, SUN G Z, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, China [J]. Chin Med J,2007,120(9):814-819.
- [13] 叶远馨,陆小军,宋兴勃,等. Hain 法检测不同来源标本结核耐药性及突变位点分析[C]//中华医学会. 中华医学会第七次全国中青年检验医学学术会议论文集:2012 年卷. 北京:中华医学会,2012:195-198.
- [14] 于霞,尚媛媛,赵立平,等. 分子杂交法快速鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的初步评价[J]. 检验医学,2014, 29(10):1037-1040.

(收稿日期:2017-07-23 修回日期:2017-09-29)

(上接第 391 页)

试验结果的判断和临床意义的分析。

综上所述,本文所建方法将 TRFIA 的灵敏性、磁分离技术的高反应效率相结合,在显著缩短反应时间的基础上,获得可靠的临床检验结果且重复性良好,如果有相关配套设施跟进即可形成全自动化操作,具有良好的推广意义。

参考文献

- [1] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015.
- [2] 焦艳华,梁媛媛,郭卫强. 基于磁性微球 HCG 化学发光免疫检测方法的研究[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版),2014,13(5):495-498.
- [3] 周敏,陆仁飞,杨旻. 磁分离酶联免疫法检测 SCC-Ag 的方法学研究[J]. 南通大学学报(医学版),2014,34(2): 107-110.
- [4] 熊会玲,范彦,胡美,等. 血清 CA199 对良恶性胆道疾病的意义[J]. 临床消化病杂志,2013,25(6):327-329.
- [5] 刘太峰,赫红姣,张一帆. PET-CT 在消化道肿瘤术后 CEA、CA199 升高患者中的应用价值[J]. 中国医学创新, 2012,9(27):70-71.
- [6] 李凤焕,王晓东,向鑫. 消化道恶性肿瘤血清 CA199 检测的临床意义[J]. 中国医药导刊,2013,15(5):876-878.
- [7] KELLY P J, ARCHBOLD P, PRICE J H, et al. Serum

CA199 levels are commonly elevated in primary ovarian mucinous tumours but cannot be used to predict the histological subtype[J]. J Clin Pathol,2010,63(2):169-173.

- [8] WU H B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta,2006,369(2):119-124.
- [9] ZHANG Q Y, WANG X, LI Z J, et al. Evaluation of a-fetoprotein (AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases[J]. Analytica Chimica Acta,2009, 631(2):212-217.
- [10] 殷实,古宏晨,徐宏. 基于磁性纳米颗粒磁学信号的生物检测技术[J]. 生物医学工程学杂志,2013,30(4):879-883.
- [11] OSAKA T, MATSUNAGA T, NAKANISHI T, et al. Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays[J]. Analytical Bioanal Chem,2006,384(3):593-600.
- [12] JIN S Q, YIN B C, YE B C. Multiplexed bead-based mesofluidic system for detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(21): 6647-6654.
- [13] KIM S M, CHAE M K, YIM M S, et al. Hybrid PET/MR imaging of tumors using an oleanolic acid-conjugated nanoparticle[J]. Biomaterials,2013,34(33):8114-8121.

(收稿日期:2017-07-25 修回日期:2017-09-27)