

基因芯片检测结核分枝杆菌耐药基因效能分析*

孙正松¹, 曾方林¹, 戴洁¹, 王金富^{1,2△}

(1. 扬州市第三人民医院, 江苏扬州 225025; 2. 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏扬州 225002)

摘要:目的 评价基因芯片检测结核分枝杆菌(MTB)耐药性的效能。方法 选取 140 例 MTB 阳性的痰标本进行基因芯片检测和传统药敏试验检测, 分析基因芯片法对异烟肼(INH)、利福平(RFP)耐药性检测的灵敏度、特异度、准确度。对两种结果不符合的标本进行耐药基因测序检验。结果 INH 耐药基因检测的灵敏度 89.5%, 特异度 96.1%; RFP 耐药基因检测的灵敏度 86.4%, 特异度 97.9%。痰和菌株进行基因芯片检测的结果一致率为 97.1%, 用痰标本进行基因芯片耐药基因检测报告时间为(3.6±1.5) d, 传统药敏报告时间为(65.1±4.9) d。结论 利用痰标本进行的基因芯片检测可作为一种高效的 MTB 耐药筛查方法。

关键词: 基因芯片; 结核分枝杆菌; 耐药检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.22.013

中图法分类号: R446.5; R-331

文章编号: 1673-4130(2018)22-2771-03

文献标识码: A

Analysis of drug resistance efficacy of mycobacterium tuberculosis in gene chip*

SUN Zhengsong¹, ZENG Fanglin¹, DAI Jie¹, WANG Jinfu^{1,2△}

(1. Yangzhou Third People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225025, China;

2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou, Jiangsu 225002, China)

Abstract: Objective To evaluate the efficacy of gene chip for detection of drug resistance detection of mycobacterium tuberculosis (MTB). **Methods** Genetic chip detection and traditional drug susceptibility test were performed in 140 positive specimens. The drug resistance gene sequencing was performed on specimens that were not consistent with the two results. The sensitivity, specificity and accuracy of gene chip method for the detection of isoniazid (INH) and rifampicin (RFP) were analyzed. **Results** Sensitivity of INH detection was 89.5% and specificity was 96.1%; The sensitivity of RFP detection was 86.4% and specificity was 97.9%. The results of gene chip detection in phlegm and strain was 97.1%. The detection report of gene chip with sputum was (3.6±1.5)d; the time of traditional drug sensitive report was (65.1±4.9)d. **Conclusion** Genetic chip detection using sputum specimen can be used as an effective screening method for MTB drug resistance detection.

Key words: gene chip; mycobacterium tuberculosis; drug resistance testing

我国近年来结核病发病率呈逐年下降趋势, 但耐药结核的感染率却有所上升, 全国第五次结核病流行病学抽样调查我国耐药结核比例高达 42.1%^[1]。耐药结核分枝杆菌(MTB)的传染性和致死率均较强, 若不能及时并有效将感染耐药结核病人进行管理, 势必会造成耐药结核的流行。传统的 MTB 耐药检测的是耐药表型, 方法是固体培养法, 包括比例法和绝对浓度法, 此法耗时较长(大约需要 8~10 周), 已严重影响耐药结核病人的及时发现和治愈。如何快速诊断耐药结核患者是一个迫切需要解决的问题。

晶芯®基因芯片试剂盒是通过检测 MTB 的利福

平(RFP)耐药基因 rpoB 和异烟肼(INH)耐药基因 katG、inhA 是否发生突变, 推断 MTB 是否存在 INH 和 RFP 产生耐药。本研究以传统 MTB 药敏试验(比例法)为参考, 评价基因芯片检测 MTB 耐药的技术的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集来本院就诊肺结核病患者的痰标本, 选取抗酸分枝杆菌涂片和培养均阳性标本共 149 例, 去除经鉴定为非 MTB 的 9 例, 共计 140 例; 抗酸分枝杆菌涂片阴性且 MTB 核酸检测阳性的 50 例。

* 基金项目: 江苏省人兽共患病学重点实验室开放课题资助项目(R1702); 扬州市社会发展项目(YZ2016088)。

作者简介: 孙正松, 男, 副主任技师, 主要从事结核病免疫研究。△ 通信作者, E-mail: wjf0020@sina.com。

本文引用格式: 孙正松, 曾方林, 戴洁, 等. 基因芯片检测结核分枝杆菌耐药基因效能分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(22): 2771-

1.2 仪器与试剂 仪器: Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪由美国安捷伦公司提供, 基因芯片检测配套仪器由北京博奥生物有限公司提供。试剂: 传统培养和药敏试剂由珠海贝索生物有限公司提供, PCR 扩增仪和基因芯片试剂由北京博奥生物有限公司提供。耐药基因 PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 见表 1。

表 1 耐药基因扩增引物信息

耐药药物	耐药基因	引物序列
INH	katG	F: GATCGTCGGCGTCACTT
	katG	R: CGTTGACCTCCCACCGACT
	inhA	F: CGATATGACCGCGCTGGA
	inhA	R: GCGCCACGAACCTGTTGACC
RFP	rpoB	F: GAGCCCCGACCAAAGA
	rpoB	R: ATGTTGGGCCCTCAGG

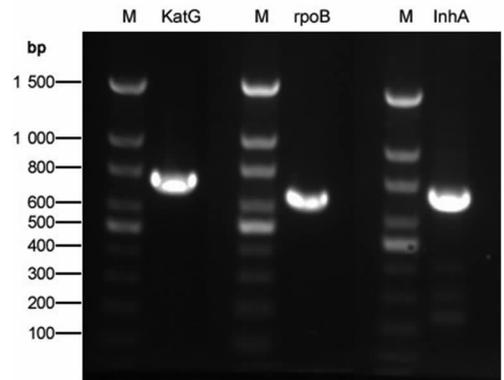
1.3 方法 痰液化处理: 将痰标本用 4% 的氢氧化钠溶液液化, 液化好的上清液用于接种固体培养基和核酸提取。传统培养和药敏试验: 严格按《结核病实验室检测操作规程》的要求进行, 并定期用 H37RV 进行质控。核酸提取: 煮沸法提取核酸。MTB 核酸检测 (PCR-荧光探针法): 严格按试剂说明书操作, 并定期质控。基因芯片: 核酸进行 PCR 扩增, 产物用杂交缓冲液处理后在芯片杂交仪上进行杂交, 再用芯片洗干仪进行洗涤和甩干, 最后用芯片判读系统进行扫描和结果判读, 并详细记录判读结果和芯片信息。基因芯片结果与传统药敏不同的, 将核酸进行耐药基因 PCR 扩增, 扩增产物琼脂糖凝胶电泳以验证扩增产物是否合格, 合格产物送南京金斯瑞生物科技有限公司进行耐药基因 DNA 测序, 以 MTB 标准株 H37Rv 序列作为参考序列, 利用序列比对软件 MegAlign, 将 PCR 产物测序序列与参考序列进行比对, 从而得到突变位点的位置和类型结果。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 软件进行统计学处理数据, 两种方法检测结果的差异性应用配对四格表 χ^2 检验判别, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。两种方法检测结果的一致性应用 Kappa 检验判别: $Kappa \geq 0.75$ 表示一致性较好, $0.40 < Kappa < 0.75$ 表示一致性一般, $Kappa < 0.40$ 表示一致性较差。

2 结果

2.1 基因芯片检测 RFP 效能分析 传统药敏检测到 RFP 耐药 44 例, 基因芯片法检出 38 例, 灵敏度为 86.4%; 传统药敏检测到 RFP 敏感 96 例, 基因芯片法检出 94 例, 特异度为 97.9%; 基因芯片结果与传统药敏结果一致的有 132 例, 准确度为 94.3%; 基因芯片检测 RFP 耐药的阳性预测值为 95.0%, 阴性预测值为 94.0%; 两种方法的比较, Kappa 值为 0.895, 表明一致性较好; 两种方法的差异无统计学意义 ($P >$

0.25)。
2.2 基因芯片检测 INH 效能分析 传统药敏检测到 INH 耐药 38 例, 基因芯片法检出 34 例, 灵敏度为 89.5%; 传统药敏检测到 INH 敏感 102 例, 基因芯片法检出 98 例, 特异度为 96.1%; 基因芯片结果与传统药敏结果一致的有 132 例, 准确度为 94.3%; 基因芯片检测 INH 耐药的阳性预测值为 89.5%, 阴性预测值为 96.1%; 两种方法的比较, Kappa 值为 0.856, 表明一致性较好, 两种方法的差异无统计学意义 ($P >$ 0.25)。
2.3 位点突变检测比较 基因芯片漏检 2 例 RFP 329 位点突变, 329 位点不在基因芯片试剂所检测的序列之中, 其余的检测方法与 DNA 测序结果相符。



注: M 为 DNA Marker

图 1 MTB katG、rpoB、inhA 基因 PCR 产物电泳图

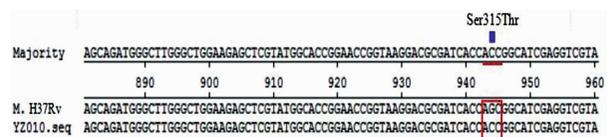


图 2 部分菌株 katG 基因测序多序列比对图

2.4 140 例痰标本和培养分离的菌株基因芯片检测结果一致的有 136 例, 一致率为 97.1%。 利用痰进行基因芯片检测报告时间为 (3.6 ± 1.5) d, 利用菌株进行基因芯片检测报告时间为 (31 ± 5.8) d, 传统药敏报告时间为 (65.1 ± 4.9) d。

2.5 50 例 MTB 核酸检测阳性的标本, 循环阈值 (Ct) ≤ 30 的 43 例均可得到基因芯片检测结果, Ct > 30 的 7 例中 6 例无法进行基因芯片检测。

3 讨论

基因芯片又称 DNA 微阵列技术, 是根据 MTB 基因组上保守的基因序列 (如 16S rRNA、23S rRNA、IS6110 等) 设计寡核苷酸探针等, 将其固定于载体上, 与互补的靶基因序列杂交, 通过荧光检测装置检测荧光信号强度来进行分析。基因芯片实现了检测的自动化、集成化和微型化, 能同时进行大量的基因分析^[2], 大大提高了实验效率, 成为近年来对 MTB 耐药性进行快速检测的研究热点。

研究表明, 大约 95% 的 RFP 耐药与 rpoB 基因的

突变有关^[3-4], rpoB 基因突变主要发生在位于 rpoB 基因的 507~533 位的 RFP 耐药决定区^[5]。大约 80% 的 INH 耐药与 katG、ihnA 基因突变有关 katG^[6], katG 基因突变主要发生在 315 位点, ihnA 基因突变主要是 C(-15)T 启动子突变^[7]。基因芯片通过检测 MTB 耐药基因是否发生突变, 从而推断 MTB 对 RFP、INH 的耐药性。本研究表明, 基因芯片检测 RFP 耐药性的灵敏度 89.2%, 特异度 97.9%, 基因芯片检测 INH 耐药性的灵敏度 89.5%, 特异度 96.1%, 与赵冰等^[8]、何建等^[9]、周杨等^[10] 研究结果相似, 说明基因芯片检测 MTB 耐药性的灵敏度和特异度均较好。基因芯片除漏检 2 例 329 位点外, 其余检测结果均与 DNA 测序结果一致, 表明基因芯片检测的准确性较高。但基因芯片未能覆盖 RFP 和 INH 的所有耐药位点, 可能导致极少数耐药菌株被误判为敏感菌株, 在实际应用中需要结合传统药敏结果进行判别。

基因芯片检测到 1 例 RFP 密码子 533(CTG→CCG) 突变, 但传统药敏检测结果为敏感, 可能是因为 533 位密码子突变通常只引起低水平耐药^[11]。有 3 例基因芯片检测到耐药基因常见突变, 一般情况会引起 MTB 高水平耐药, 但传统药敏检测结果为敏感, 笔者认为应该是 MTB 混合感染引起此检测差异。有研究提及此现象^[12], 但未详细分析, 要想弄清楚此现象, 尚需进一步研究。

由于 MTB 生长非常缓慢, 利用菌株进行基因芯片检测, 需 30 d 以上才能得到耐药检测结果, 仍然不能使患者得到及时准确的治疗。虽然试剂厂家推荐菌株进行基因芯片检测, 但本研究中利用痰标本进行基因芯片检测, 其检测结果与菌株检测结果的一致率较高, 且检测时间大大缩短, 只需 (3.6±1.5) d, 将有利于患者得到及时确诊和治疗, 与许榕青等^[13] 的观点相同。4 例痰和菌株的基因芯片检测结果不一致可能是由于煮沸法提取核酸的效率不高引起, 如利用 CTAB 法提取核酸应该能解决此现象。利用涂片阴性、MTB 核酸阳性痰标本直接进行基因芯片检测, 43 例 Ct≤30 的均可正常检测, 7 例 Ct>30 中的 6 例结果检测异常, 推测是由于 Ct>30 的痰标本中 MTB 的量较少, 低于基因芯片的检测限。笔者认为抗酸分枝杆菌涂片阴性、MTB 核酸检测阳性的痰标本, 若 Ct≤30 时可直接利用痰提取的核酸进行基因芯片检测, 若 Ct>30 时最好等培养出菌株再进行基因芯片检测, 与罗一钧等^[14] 的研究建议一致。

4 结 论

利用痰标本进行基因芯片检测耐药基因是否发生突变, 是一种检测 MTB 耐药性的高效快速筛查方法。

参考文献

- [1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8):485-508.
- [2] MOSTREM P, GORDON M, SOLA C, et al. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis[J]. Clin Microb Inf, 2002, 8(11):694-704.
- [3] TELENTI A. Genetics of drug resistant tuberculosis[J]. Thorax, 1998, 53(9):793-797.
- [4] WILLIAMS D L, SPRING L, COLLINS L, et al. Contribution of rpoB mutations to development of rifampin cross-resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother. 1998, 42:1853-1857.
- [5] 熊礼宽. 结核病实验诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:54-68.
- [6] HUI M, CHAN E W, CHIN M L, et al. Genotypic rpoB and gyrA profiles for detection of rifampicin and fluoroquinolone susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis isolates directly from clinical sputum specimens[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(2):186-187.
- [7] RAHIM Z, NAKAJIMA C, RAQIB R, et al. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis from Bangladesh[J]. Tuberculosis, 2012, 92(6):529-534.
- [8] 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评估[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9):718-722.
- [9] 何建, 谭芳. 基因芯片检测技术快速诊断耐药肺结核的效果分析[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(11):1171-1173.
- [10] 周杨, 欧喜超, 乐军, 等. 基因芯片诊断耐多药结核病的临床多中心研究[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(9):793-799.
- [11] MADANIA A, HABOUS M, ZARZOUR H, et al. Characterization of mutations causing rifampicin and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis in Syria[J]. Pol J Microbiol, 2012, 61(1):23-32.
- [12] WANG X, LIU H, WEI J, et al. An investigation on the population structure of mixed infections of Mycobacterium tuberculosis in Inner Mongolia, China[J]. Tuberculosis, 2015, 95(6):695-700.
- [13] 许榕青, 李丹, 林银霞, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性临床应用评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(1):43-48.
- [14] 罗一钧, 杨建林. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9):1136-1137.