

54.

- [6] 吕海光,王环宇,李真,等.血清肌红蛋白检测在急性心肌梗死临床检验中的应用效果分析[J].中国实用医药,2018,13(31):44-45.
- [7] BRUNORI M, BOURGEOIS D, VALLONE B. The structural dynamics of myoglobin [J]. J Struct Biol, 2004, 147(3):223-234.
- [8] BHAYANA V, RALPH HENDERSON A. Biochemical markers of myocardial damage[J]. Clin Biochem, 1995, 28(1):1-29.
- [9] 朱吉刚.4种血清心肌标志物在AMI患者中的水平及其临床意义分析[J].国际检验医学杂志,2018,39(13):1642-1645.

## • 短篇论著 •

- [10] 丁红梅,储楚,杨瑞霞,等.高敏肌钙蛋白T和肌红蛋白在肾功能不全患者中的变化及意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(14):1708-1711.
- [11] 郑佐娅,曹丹如,陈悦,等.检测肌红蛋白的半定量金免疫层析法的研究[J].检验医学,2007,22(6):645-647.
- [12] 马宏伟,赵卫国,潘柏申.血清肌红蛋白光激化学发光免疫测定法的建立[J].检验医学,2006,21(1):55-57.
- [13] 刘行超,曾桂芬,农妍,等.免疫比浊法检测肌红蛋白的性能验证及临床应用评估[J].检验医学与临床,2015,12(7):883-884.

(收稿日期:2019-04-11 修回日期:2019-07-21)

## 基因芯片技术对结核分枝杆菌利福平及异烟肼的耐药性检测研究<sup>\*</sup>

孙桂英,赵刚,沈燕,徐密琴,高胜利,俞净,钮志林<sup>△</sup>

(苏州市吴江区第一人民医院感染科,江苏苏州 215200)

**摘要:**目的 考察基因芯片技术检测结核分枝杆菌(Mtb)对利福平(RFP)与异烟肼(INH)耐药性的效果。**方法** 选取苏州市吴江区第一人民医院感染科发现的痰液涂片阳性的结核病患者纳入研究。采用基因芯片技术检测Mtb对RFP与INH的耐药性,并与传统药敏试验结果进行对比,同时采用DNA测序进行验证。**结果** 基因芯片检测RFP耐药的符合率为97.47%,灵敏度为94.90%,特异度为97.81%,阳性预测值为85.32%,阴性预测值为99.31%,Kappa值为0.952;检测INH耐药的符合率为94.45%,灵敏度为78.16%,特异度为99.84%,阳性预测值为99.38%,阴性预测值为93.25%,Kappa值为0.823;检测MDR的符合率为97.83%,灵敏度为82.50%,特异度为99.47%,阳性预测值为94.29%,阴性预测值为98.16%,Kappa值为0.927;经DNA测序验证,基因芯片检测RFP与INH耐药准确率分别为99.52%与99.76%。**结论** rpoB531、526位点突变与katG315位点突变可能是苏州吴江地区Mtb产生RFP和INH耐药的关键性分子机制,基因芯片技术能快速且高准确地检测出这些位点的突变情况,对INH耐药检测的灵敏度尚有较大提升空间。

**关键词:**基因芯片; 耐药; 利福平; 异烟肼**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.23.026**文章编号:**1673-4130(2019)23-2924-04**中图法分类号:**R446.5**文献标识码:**B

结核病是因感染结核分枝杆菌(Mtb)而发生的并具有传染性的慢性疾病,可累及全身各种器官,最为常见是以肺部受累形成的肺结核病。根据WHO的2016年结核病年度报告显示<sup>[1]</sup>,肺结核病在2015年的全球新发病例高达1 040万例,死亡病例为140万例,超过HIV;同年我国新发生肺结核病91万例,仅次于印度(238万例)与印尼(102万例)位列全球第3位,死亡病例约3.5万。当前,我国是全球22个结核病高负担国家及27个耐多药(MDR)结核病高负担国家之一<sup>[2]</sup>。自1993年WHO宣布“全球结核病紧急状态”以来,多个国家及地区陆续出现了1例或多例

MDR结核病。全球有3.9%的新发病例和21%的复诊患者患有MDR结核病<sup>[1]</sup>。结核病耐药已成为全世界结核病疫情防控的巨大阻碍。建立有效且快速的Mtb耐药检测方法对临床合理用药及结核病疫情防控意义重大。长期以来,传统罗氏比例法由于操作简单、经济、方便、易于推广等因素而被广泛应用于Mtb药敏试验,并被视为结核病诊断的“金标准”。但该方法耗时较久,步骤繁琐,已很难满足当前对MDR结核病诊断及时性的需求。伴随着Mtb耐药分子机制的阐明,几种快速检测结核病耐药的分子药敏检测技术得以问世,其中基因芯片技术日益受到重视。与此同

<sup>\*</sup> 基金项目:吴江区卫计委科教兴卫项目(WWK201608);吴江一院院级项目(院201605)。<sup>△</sup> 通信作者,E-mail:niuzhilin1023@yahoo.com。

本文引用格式:孙桂英,赵刚,沈燕,等.基因芯片技术对结核分枝杆菌利福平及异烟肼的耐药性检测研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(23):2924-2927.

时,近年来受耐药率不断升高的影响,利福平(RFP)与异烟肼(INH)这一经典的抗结核病一线药物组合在苏州吴江地区的治疗效果有所降低。本研究采用基因芯片技术对 Mtb 的耐药性进行检测,并与传统罗氏比例法药敏试验结果进行对比,同时采用 DNA 测序验证,旨在探讨基因芯片法对苏州地区 Mtb 临床分离株 RFP 与 INH 耐药性快速检测的实用价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2016 年 5 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日在苏州市吴江区第一人民医院感染科发现的痰液标本涂片阳性的结核病患者。以无菌容器连续 3 d 采集所有患者的第 1 口晨痰 2~5 mL 并及时送检。

**1.2 试剂与仪器** 晶芯<sup>®</sup>系列试剂或仪器均购自博奥生物公司,包括核酸快速提取仪(ExtractorTM 36)、芯片洗干仪(SlideWasherTM 8)、芯片杂交仪(BioMixerTM II)、微阵列芯片扫描仪(LuxScan™ 10K-B)、Mtb 耐药基因检测试剂盒与菌种鉴定试剂盒;实时 PCR 扩增仪(美国伯乐),改良罗氏培养基(海博生物),PNB 与 TCH 菌种鉴定培养基。

## 1.3 方法

**1.3.1 罗氏培养药敏试验** 严格按照《结核病诊断实验室检验规程》<sup>[3]</sup>进行试验操作。采用 2 倍于痰标本量的标本消化液进行样本前处理,接种至改良罗氏培养基后进行恒温(37 °C)培养,观察到阳性培养结果后即行比例法药敏试验及菌种鉴定,阴性培养结果延长培养时间,最长不超过 8 周。将临床分离 Mtb 的初生长 2 周菌落研磨并配成菌悬液,浓度 1 mg/mL,梯度稀释,目标浓度分别为 10<sup>-2</sup> mg/mL 与 10<sup>-4</sup> mg/mL,分别满环沾取并接种至含 RFP(40 μg/mL)与 INH(0.2 μg/mL)的药敏试验培养基,同时采用 PNB 与 TCH 培养基鉴定菌种。所有样本完成以上处理后均进行恒温(37 °C)培养,4 周后观察结果。本研究以 Mtb 标准菌株 H37RV 为质控菌株。

**1.3.2 基因芯片检测** 选择 RFP 耐药基因 rpoB 及

INH 耐药基因 katG 与 inhA 作为本次检测的目标基因,检测 Mtb 中以上基因启动子的野生型(wt)及多种突变型(mt),具体实验操作严格按照试剂盒说明书及实验室操作标准程序进行。(1)采用核酸快速提取仪进行核酸提取;(2)在提取好核酸的离心管中加入 PCR 扩增试剂进行 PCR 扩增;(3)在 PCR 扩增反应结束后对标本进行芯片杂交,扩增产物按说明书加杂交缓冲液加入芯片,放入 56 °C 水浴箱 2 h;(4)芯片杂交结束后,将芯片按照说明书所配置好的洗涤液进行洗涤,洗涤后进行干燥;(5)采用微阵列芯片扫描仪对干燥后芯片进行扫描,软件读取信号并自行判读结果。

**1.3.3 DNA 测序验证** 对经罗氏比例法检测的 Mtb 阳性菌株,进行 3 个目标基因耐药相关区域扩增产物的 DNA 测序,具体测序工作由博奥生物公司完成,采用第一代 DNA 测序技术双脱氧链终止法进行核酸测序。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 统计学软件进行数据分析,对配对计数资料进行交叉制表下的  $\chi^2$  检验分析两种检验方式是否存在差异, $P < 0.05$  为差异有统计学意义;采用 Kappa 检验分析两种检验方法的结果一致性,Kappa  $\geq 0.75$  为一致性良好。

## 2 结 果

**2.1 标本检测情况** 本研究共纳入 300 例痰液涂片阳性肺结核患者的共计 900 份痰标本,排除 31 份(3.44%)培养阴性及 7 份(0.78%)培养污染标本后对 862 份标本进行了药敏试验与菌种鉴定。862 份标本中有 4 份(0.46%)药敏试验失败,5 份(0.58%)菌种鉴定为非结核分枝杆菌(NTM),最终有 853 份可用于药敏分析。900 份痰标本中,基因芯片检测未检测到 Mtb 的有 11 份(1.22%),NTM9 份(1.00%),结果不能判定的有 17 份(1.89%),最终有 863 份可用于药敏分析。综合药敏试验与基因芯片检测结果,最终有 829 份标本的检测结果可用于药敏检测结果的比较。

表 1 基因芯片检测 Mtb RFP 和 INH 耐药相关突变位点情况

突变基因	突变位点	密码子改变	菌株(n)	突变率(%)
rpoB	511	T→C	7	6.42
	513	A→C 或 C→A	4	3.67
	516	G→T 或 A→G 或 A→T	6	5.50
	526	A→G 或 A→T 或 C→G 或 C→T	26	23.85
	531	C→T 或 C→G	62	56.88
	533	T→C	3	2.75
	511,516	T511C,G516T 或 T511C,A516T 或 T511C,A516G	1	0.92
katG	315	G→A 或 G→C	112	69.14
inhA	-15	C→T	47	29.01
KatG/inhA 双突变	315/-15	G315C/C(-15)T 或 G315A/C(-15)T	3	1.85

注:密码子改变一栏中的数字前后字母分别为 wt 与 mt 碱基

**2.2 基因芯片检测 Mtb 耐药基因相关突变位点** 基因芯片检出 rpoB 突变型菌株 109 株,包括单一位点突变 108 株与双位点突变 1 株。突变频率最高的 2 个位点分别为 531 位点[56.88% (62/109)]与 526 位点[23.85% (26/109)]。基因芯片检出 katG/inhA 突变型菌株 162 株,包括 katG315 单一位点突变 112 株[69.14% (112/162)], inhA-15 单一位点突变 47 株[29.01% (47/162)], katG315 位点与 inhA 启动子区域双突变 3 株[1.85% (3/162)]。见表 1。

表 2 基因芯片与罗氏比例法检测 RFP、INH 及 MDR 的结果比较(*n*)

基因芯片	罗氏培养法		$\chi^2$	<i>P</i>
	耐药	敏感		
RFP(mt)	93	16	0.668	0.414
RFP(wt)	5	715		
INH(mt)	161	1	6.762	0.009
INH(wt)	45	622		
MDR	66	4	0.733	0.392
非 MDR	14	745		

**2.3 基因芯片与罗氏比例法检测 RFP、INH 及 MDR** 基因芯片与罗氏比例法检测 RFP 耐药及 MDR 的效果相近(均  $P > 0.05$ ),对 INH 耐药的检测差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2;以罗氏比例法为金标准,对基因芯片检测 RFP、INH 耐药及 MDR 的评估见表 3。

表 3 基因芯片检测 RFP、INH 及 MDR 的效果评价

项目	一致率 (%)	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测 值(%)	阴性预测 值(%)	Kappa 值
RFP	97.47	94.90	97.81	85.32	99.31	0.952
INH	94.45	78.16	99.84	99.38	93.25	0.823
MDR	97.83	82.50	99.47	94.29	98.16	0.927

注:本研究中,将对 RFP 与 INH 均耐药定义为 MDR

**2.4 基因芯片技术与 DNA 测序的对比** 以 DNA 测序结果作为金标准,基因芯片检测 RFP 耐药结果不一致为 4 株,检测准确率为 99.52% (825/829);检测 INH 耐药结果不一致为 2 株,检测准确率为 99.76% (827/829),相关分离菌株检测结果的不一致基因位点见表 4。

表 4 基因芯片技术与 DNA 测序结果对比

分离株序号	罗氏比例法	DNA 测序	基因芯片
7-516	RFP 耐药	rpoB(wt)	rpoB 531(C→T)
1-383	RFP 耐药	rpoB 526(C→A) 和 rpoB 533(T→C)	rpoB(wt)
4-983	RFP 敏感	rpoB 533(T→C)	rpoB(wt)
7-441	RFP 耐药	rpoB 511(T→C) 和 rpoB 512(A→G)	rpoB(wt)
5-79	INH 耐药	inhA-8(T→C)	katG、inhA(wt)
10-714	INH 耐药	katG315(C→A)	katG、inhA(wt)

### 3 讨 论

随着全程督导化学治疗策略的逐步开展,我国个别地区结核病疫情开始有所缓解,但全国总体形式严峻依旧,区域化流行趋势差别仍然存在<sup>[4]</sup>。鉴于本院所属苏州吴江地区的 RFP 与 INH 耐药结核病病例逐年增多的趋势明显,寻求一种及时、准确的耐药性检测方法对有效控制本地区耐多药结核病的流行与传播具有重要的现实意义。与传统方法相比,生物芯片技术具有快速、结果可靠、重复性好、通量高、可以在一个反应中检测成千基因表达的特点,为 Mtb 的实验室诊断开拓了新的途径,更满足了当前临床快速检测之需求<sup>[5]</sup>。

研究表明<sup>[6-7]</sup>,95%以上的 RFP 耐药与 rpoB 基因变异有关。本研究选择了几种 rpoB 基因常见突变位点(511、513、516、526、531、533 位点),考察与苏州吴江地区 RFP 耐药的相关性。基因芯片检测结果表明,本地区 RFP 耐药基因 rpoB 的突变类型包括 511 (T→C)、513(A→C 或 C→A)、516(G→T 或 A→G 或 A→T)、526(A→G 或 A→T 或 C→G 或 C→T)、531

(C→T 或 C→G)、533(T→C)等单位点突变以及 511 与 516 的双位点突变,其中的 531(C→T 或 C→G)与 526(A→G 或 A→T 或 C→G 或 C→T)为主要突变类型,突变率分别为 56.88% 与 23.85%。KatG 基因 315 位点突变与 inhA 基因-15 位点突变不仅普遍存在于耐药 Mtb 中,同时也与 INH 耐药高度相关。基因芯片检测结果表明,本地区 INH 耐药基因的主要突变类型为 KatG315(G→A 或 G→C),突变率达 69.14%,与吉林省(68.55%)<sup>[8]</sup>相似,但与青岛(44.83%)<sup>[9]</sup>及青海(75.5%)<sup>[10]</sup>等地区明显不同,提示 KatG315 突变存在一定地域差异。后经 DNA 测序验证,基因芯片检测 RFP 与 INH 耐药相关基因突变位点不一致分别为 4 株与 2 株,检测准确率分别为 99.52% 与 99.76%。表明本次采用基因芯片检测 Mtb RFP 和 INH 耐药相关突变位点的结果是可靠的,总体提示 rpoB531、526 位点突变及 katG315 位点突变可能是促成苏州吴江地区 RFP 和 INH 耐药病例增多最为关键的分子机制。

本研究中,基因芯片与罗氏比例法药敏试验检测

RFP 耐药及 MDR 效果相近, 对 INH 耐药的检测结果存在明显差异, 由于罗氏比例法药敏试验为金标准, 故初步认为基因芯片对 INH 耐药检测的一致性可能不及 RFP 与 MDR。具体效果: 以罗氏比例法为金标准, 基因芯片检测 RFP 耐药的符合率为 97.47%, 灵敏度为 94.90%, 特异度为 97.81%, 阳性预测值为 85.32%, 阴性预测值为 99.31%, Kappa 值为 0.952; 检测 INH 耐药的符合率为 94.45%, 灵敏度为 78.16%, 特异度为 99.84%, 阳性预测值为 99.38%, 阴性预测值为 93.25%, Kappa 值为 0.823; 检测 MDR 的符合率为 97.83%, 灵敏度为 82.50%, 特异度为 99.47%, 阳性预测值为 94.29%, 阴性预测值为 98.16%, Kappa 值为 0.927。由此可见, 基因芯片检测 RFP 耐药及 MDR 的效果是值得肯定的, 但检测 INH 耐药的符合率、灵敏度、阴性预测值以及 Kappa 值均相对偏低, 其中灵敏度明显偏低, Kappa 值低也进一步印证了其与金标准检测一致性存在一定不足。分析原因可能包括以下几方面: (1) 非基因突变的原发性耐药造成对 INH 的耐药性, 现已探明的机制为多层 Mtb 胞外包被与活性多药外排离子泵构成了屏障机制, 继而对药物运输产生干扰<sup>[11-12]</sup>; (2) 非 KatG 与 inhA 基因(如 ahpC、KasA、ndh 等)的突变也与 INH 耐药具有一定相关性<sup>[13]</sup>; (3) KatG 与 inhA 基因中除本研究选择 315 及 -15 位点的极少数其他位点突变也可能引起 INH 耐药<sup>[14-15]</sup>。但总体来看, 74.52% 的灵敏度尚在可接受范围, 同时基于检测的及时性优势, 笔者认为基因芯片在苏州吴江地区临床 INH 耐药菌株的快速诊断价值不应被忽视。

综上所述, rpoB531、526 位点突变与 katG315 位点突变可能是苏州吴江地区 Mtb 产生 RFP 和 INH 耐药的关键性分子机制, 基因芯片技术能快速且高准确地检测出以上位点的突变情况, 值得在本地区推广应用 RFP 和 INH 的耐药性检测。但基因芯片技术尚不能检出所有的基因突变位点, 本研究中其对 INH 耐药的灵敏度相对偏低, 提示现阶段该技术还必然存在某些局限, 但可作为传统药敏试验的重要补充。本课题组拟在后续研究中酌情增加相关基因位点进行检测, 以期进一步提高本地区对 RFP 和 INH 耐药性检测的敏感度。

## 参考文献

- [1] WHO. Global tuberculosis report<sup>[R]</sup>. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [2] 冯彦军, 陈兴年, 李小红, 等. 结核耐药基因 rpoB/katG/inhA 早期筛查 MDR-TB 的临床研究[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(11): 1946-1949.
- [3] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程<sup>[M]</sup>. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 30-68.
- [4] 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 年)<sup>[M]</sup>. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 2-5.
- [5] WU W, CHENG P, LYU J, et al. Tag array gene chip rapid diagnosis anti-tuberculosis drug resistance in pulmonary tuberculosis—a feasibility study[J]. Tuberculosis, 2018, 110(5): 96-103.
- [6] OCHANG E A, UDOH U A, EMANGHE U E, et al. Evaluation of rifampicin resistance and 81-bp rifampicin resistant determinant region of rpoB gene mutations of Mycobacterium tuberculosis detected with XpertMTB/Rif in Cross River State, Nigeria[J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5 Suppl 1: S145-S146.
- [7] KHOSRAVI A D, GOODARZI H, ALAVI S M, et al. Detection of genomic mutations in katG, inhA and rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(1): 57-62.
- [8] 张炜煜, 杨修军, 王慧, 等. 吉林省耐多药结核分枝杆菌 rpoB 及 katG 基因突变特征分析[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(10): 1731-1735.
- [9] 王军, 邹悦, 苏海涛. 结核分枝杆菌 katG315 突变特征及其与异烟肼耐药关系[J]. 青岛大学医学院学报, 2015, 51(1): 58-60.
- [10] 王芝, 马如存, 卓玛, 等. 青海地区结核分枝杆菌检测与 KatG、rpoB 及 gyrA 的突变特征分析[J]. 实用临床医药杂志, 2013(16): 23-25.
- [11] 张敬蕊, 李桂莲, 赵秀芹, 等. 异烟肼诱导单耐异烟肼结核分枝杆菌假定药物外排泵基因表达量变化的初步研究[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(4): 380-384.
- [12] NARANG A, GIRI A, GUPTA S, et al. Contribution of putative efflux pump genes to isoniazid resistance in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Mycobacteriol, 2017, 6(2): 177-183.
- [13] BROSSIER F, BOUDINET M, JARLIER V, et al. Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low-and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2016, 100(1): 15-24.
- [14] DOMINGUEZ J, BOETTGER E C, CIRILLO D, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(1): 24-42.
- [15] UNISSA A N, SUBBIAN S, HANNA L E, et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Genet Evol, 2016, 45(1): 474-492.