

基因芯片与罗氏绝对浓度法对结核分枝杆菌耐药检测的效果比较*

吴玉姣^{1,2}, 朱珊梅², 徐军英², 缪丽燕^{1△} (1. 苏州大学附属第一医院, 江苏苏州 215006; 2. 江苏省常州市第三人民医院 213000)

【摘要】 目的 探讨基因芯片与罗氏绝对浓度法检测结核分枝杆菌耐药性的效果。**方法** 对 2012~2013 年收集的 180 例标本进行痰液结核分枝杆菌培养, 采用基因芯片检测抗结核药利福平和异烟肼的耐药性, 同时采用罗氏绝对浓度法药敏检测进行对照, 评价其灵敏度、特异度和符合率。**结果** 以罗氏绝对浓度法作为金标准, 基因检测结果显示, 利福平耐药性的灵敏度为 92.3%、特异度为 97.1%、准确度为 95.0%; 而异烟肼的灵敏度为 85.4%、特异度为 93.9%、准确度为 90.0%。基因检测结果显示, 利福平存在 *rpoB* 基因突变, 异烟肼可能存在 *inhA*、*katG* 和 *ahpC* 基因突变。**结论** 基因芯片法和罗氏绝对浓度法对利福平和异烟肼耐药性检测具有较好的一致性, 但基因芯片更具快速、准确的特点, 值得临床推广应用。

【关键词】 基因芯片; 结核分枝杆菌; 利福平; 异烟肼

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.010 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1325-03

Comparison of effects of gene chips and Roche absolute concentration method for detecting Mycobacterium tuberculosis drug resistance* WU Yu-jiao^{1,2}, ZHU Shan-mei², XU Jun-ying², MIAO Li-yan^{1△} (1. First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China; 2. Changzhou Municipal Third People's Hospital, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of gene chips and Roche absolute concentration method for detecting Mycobacterium tuberculosis drug resistance. **Methods** Totally 180 sputum samples collected during 2012—2013 were performed the Mycobacterium tuberculosis culture. The gene chips were used to detect the resistance to rifampin and isoniazid, meanwhile the Roche absolute concentration method was used to conduct the drug susceptibility test as control. The sensitivity, specificity and coincidence rate were evaluated. **Results** With the Roche absolute concentration method as the gold standard, the genetic test results showed that the sensitivity, specificity and accuracy of rifampicin resistance were 92.3% 97.1% and 95.0% respectively; and those of isoniazid were 85.4%, 93.9% and 90.0% respectively. The genetic test results showed that *rpoB* gene mutation existed in rifampicin, and *inhA*, *katG* and *ahpC* mutations could exist in isoniazid. **Conclusion** The gene chip and Roche absolute concentration method for detecting rifampin and isoniazid resistance has better consistency, but the gene chip is faster and more accurate, which is worthy of clinical promotion and application.

【Key words】 gene chips; Mycobacterium tuberculosis; rifampin; isoniazid

目前, 耐药结核病仍旧是全球结核病疫情控制的最大障碍之一^[1]。而困扰结核病防治的难点主要集中在结核分枝杆菌的检出和不能及时对患者耐药情况检测。由于抗结核药物的不规范治疗, 患者体内的结核分枝杆菌对多种抗结核药物发生耐药, 从而形成耐多药结核病。罗氏绝对浓度法是目前检测结核分枝杆菌的金标准, 在结核病细菌学诊断方面具有重要意义, 其药敏试验结果在指导临床用药及耐药性检测等方面具有重要作用^[2-3]。基因芯片技术具有快速、结果可靠、重复性好、通量高、可以在一个反应中检测基因表达的特点, 为结核分枝杆菌的实验室诊断开拓新途径^[4-5]。本研究旨在利用基因芯片技术对结核分枝杆菌进行利福平和异烟肼耐药性检测, 并与传统罗氏绝对浓度法进行对比, 探讨 2 种方法的临床应用价值, 为开展有效、快速的治疗提供有利条件。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集常州市第三人民医院 2012~2013 年住院结核病患者的痰标本进行实验室涂片、分离、培养等检查, 筛选出耐多药的菌株 180 例。标准菌 H37Rv 由国家结核病参比实验室提供。

1.2 仪器与试剂 罗氏药敏试剂盒(绝对浓度法, 博慧斯公司), 基因芯片检测平台及配套试剂(北京博奥生物有限公司), 恒温箱、芯片恒温杂交仪、Mastecycler 型 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司), 药物利福平(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 20140930), 异烟肼(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 20140703), 改良罗氏培养基和药敏培养基(实验室自制)。

1.3 方法

1.3.1 罗氏绝对浓度法检测 按照《结核病诊断细菌学检验

* 基金项目: 江苏省常州市四药临床药学科科研基金(CY20130032)。

作者简介: 吴玉姣, 女, 在读硕士, 药师, 主要从事临床药学研究。 △ 通讯作者, E-mail: longlzhencanku@163.com。

规程》对结核分枝杆菌临床分离株进行传统的罗氏培养基培养及药敏试验^[6]。其中异烟肼和利福平药物浓度分低、高 2 种浓度,分别是 1、10 μg/mL 和 50、250 μg/mL。

1.3.2 基因检测 (1)DNA 提取。提取结核分枝杆菌中的 DNA 应严格按照试剂盒说明进行操作。向核酸提取管中加入 80 μL 核酸提取液,用核酸快速提取仪振荡 5 min,94 °C 水浴加热 5 min,5 000 r/min 离心 1 min。采用紫外分光光度法对 DNA 提取液进行浓度和纯度的测定,并将核酸提取液置 -20 °C 保存、备用。(2) PCR 扩增。将 PCR 扩增试剂放置室温至融化,充分混匀后 4 000 r/min 离心 15 s,将被测样品进行分装,并向每管样品中加入核酸提取液。放入 PCR 扩增仪进行扩增反应,PCR 反应条件为 94 °C 变性 10 s,58 °C 退火 20 s,延伸 72 °C 30 s,共 35 个循环;最终 72 °C 延伸 600 s,4 °C 保存。在 2 % 琼脂糖凝胶中电泳检测扩增产物。(3) 芯片杂交。将杂交缓冲液放置室温至融化,充分混匀后 4 000 r/min 离心 15 s,对每个被测样品进行分装。将扩增后产物与杂交缓冲液混合、离心,然后在 PCR 扩增仪上 95 °C 变性 5 min,取出并立即冰浴 3 min。吸取上述变性处理好的样品 13.5 μL,通过加样孔加在芯片上点阵所在区域,迅速盖好杂交盒并密封。在 50 °C 条件下杂交 2 h。(4) 芯片的洗涤与干燥。杂交结束后将芯片取出放入芯片洗干仪,平衡后 8 000 r/min 离心 5 min,甩干后的芯片利用芯片扫描仪读取检测信号。所有位点又分为野生型(敏感)和某种突变型(耐药)。(5) 耐药基因测序分析。① INH-ahpC-seq-F:5'-CTT GCC GGA A-AG ACA TGC CC-3'; INH-ahpC-seq-R:5'-CTG GTG ATA GTG GTG AAG TAG T-3'。② INH-inhA(ORF)-F:5'-CGT TTC ACA TCG CAC GGG TAG-3'; INH-inhA(ORF)-R:5'-CGA GAT GTG GAT GCC CTT GGA-3'。③ INH-inhA(req)-F:5'-ACA TAG CTC ACG CGC AAT-TC-3'; INH-inhA(reg)-R:5'-CCG ATC CCC CGG TTC CTC-3'。④ INH-katG-seq-F:5'-CGA GAC GTT TCG GCG-3'; INH-katG-seq-R:5'-CCG TCC TTG GCG GTG T-3'。⑤ REP-rpoB-seq-F:5'-GGG AGC GGA TGA CCA CCC A-3'; REP-rpoB-seq-R:5'-GCG-GTA CGG CGT TTC GAT GAA C-3'。以上均为测序引物。

1.4 观察指标 利用基因芯片和罗氏绝对浓度法分别对结核分枝杆菌进行药敏试验,评价 2 种方法的灵敏度、特异度及准确度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计分析,计量资料以率表示,2 种方法检测结果的一致性用 Kappa 检验判别(Kappa≥0.75,提示 2 者一致性较好;0.75>Kappa≥0.4,提示 2 者一致性一般;Kappa<0.4,提示 2 者一致性较差)。

2 结 果

2.1 2 种检测方法结果比较 以罗氏绝对浓度法药敏试验作为金标准,基因芯片法测定利福平耐药性的灵敏度、特异度和准确度分别为 92.3%、97.1% 和 95.0%,均高于异烟肼耐药性的灵敏度、特异度和准确度(85.4%、93.9%、90.0%)。经 Kappa 检验判别,其值分别为 0.890、0.797(均大于 0.750),说明 2 种方法的一致性较好。见表 1、2。

2.2 利福平耐药性检测比较及 rpoB 基因突变分析 以结核分枝杆菌标准株 H37Rv 为对照,180 株结核分枝杆菌进行利

福平药物的耐药性比较,基因芯片技术检测野生型(敏感)105 株,突变型(耐药)75 株;绝对浓度法检测出敏感株 102 株,耐药株 78 株。rpoB 基因耐药突变序列分析:在 102 株利福平敏感结核分枝杆菌中,有 1 株 ropB533 位发生突变。在 78 株耐药菌株中全部检测到耐药突变,各位点按照突变发生率依次为 531 位(52 株,66.7%)、526 位(21 株,26.9%)和 513 位密码子(5 株,6.4%)。

表 1 2 种方法检测利福平的结果比较(n)

基因芯片法	罗氏绝对浓度法	
	耐药	敏感
耐药	72	3
敏感	6	99

表 2 2 种方法检测异烟肼的结果比较(n)

基因芯片法	罗氏绝对浓度法	
	耐药	敏感
耐药	70	6
敏感	12	92

2.3 异烟肼耐药性检测比较及耐药基因突变分析 151 例结核分枝杆菌标本中,基因芯片技术检测野生型(敏感)98 株,突变型(耐药)82 株;绝对浓度法检测出敏感株 104 株,耐药株 76 株。主要异烟肼耐药基因突变分析:对 inhA、katG、ahpC 编码区进行测序,结果表示在 82 株异烟肼耐药株中有 69 株检测到 katG 基因突变,占 84.1%。其中 50 株为 315 位密码子突变;8 株检测到 inhA 基因突变,占 9.8%;最后检测到有 5 株异烟肼耐药株发生 ahpC 基因突变,占总耐药菌株的 6.1%。

3 讨 论

随着耐药结核病的日益增多,耐药性问题已经成为结核病控制的难题之一,因此结核病耐药性检测就尤为重要。而利福平和异烟肼作为抗结核病的一线药物,其耐药性检测对于临床结核病药物的治疗有着重要意义^[7]。传统的罗氏绝对浓度法应用较为广泛,但是缺点是周期较长,需要再得到分离株后的 3~4 周后才能获得结果。

目前,随着人们对结核分枝杆菌的进一步研究,结核分枝杆菌的基因监测开始应用于结核病的诊断和监测。在临床中,绝对罗氏浓度法仍作为结核病诊断的金标准,但其耗时较长。血清学方法是结核病诊断的重要辅助手段,但其缺乏灵敏性和特异性均高的单体蛋白作为血清学检测结核病的特异性抗原^[2]。而基因芯片技术是 20 世纪 90 年代才发展起来的生物学技术。它是通过检测耐药基因突变,快速检测药物敏感性的基因型药敏试验方法^[8],但操作技术要求相对较高。以上各种检测方法都存在各自的优势和缺陷。因此临床诊断结核病需结合多种检测方法,做到结核病的早发现、早诊断以及早治疗。

本研究采用罗氏绝对浓度法和基因芯片法对利福平和异烟肼进行耐药性检测,2 种方法的灵敏度为 92.3%、85.4%,特异度为 97.1%、93.9%,准确度为 95.0%、90.0%。表明基因芯片法与罗氏绝对浓度法耐药性检测结果一致性较好,符合临床需要,对于快速筛查结核分枝杆菌抗体耐药突变以及制订治

疗方案有着积极的作用。

利福平耐药相关突变主要集中在 rpoB 基因,其中最常见的是 531 位和 526 位,除此以外还有 513、511、522 等位点突变也可导致利福平出现耐药性^[9-10]。本研究中 rpoB 基因出现 531、526、513 位点的突变,其中最主要的是 531 位(52 株,66.7%)和 526 位(21 株,26.9%)。之前王峰等^[11]研究结果中 531 位(76.3%)、526 位(13.9%)和 516 位(6.3%)为主要突变位点。虽然不同研究当中的突变位点略有差异,但是总体来说利福平耐药突变相对比较集中。由于结核分枝杆菌对异烟肼的耐药分子机制涉及多个基因,目前还没有完全明确,其中研究较多的有 inhA、ahpC、katG 等基因。其中 katG 基因突变可导致结核分枝杆菌对异烟肼产生高度耐药性,突变位点多出现在 315 位密码子,大约有 90% 的异烟肼耐药菌株中都会出现。本研究中耐异烟肼菌株中 84.1% 发生了 katG 基因突变,9.8% 发生了 inhA 基因突变,仅有 6.3% 的菌株发生 ahpC 基因突变。

本研究以罗氏绝对浓度法作为金标准,比较基因芯片法和罗氏绝对浓度法对利福平和异烟肼药物的耐药性检测,结果显示 2 种方法均具有较好的灵敏度、特异度和准确度,具有较好的一致性。就方法学而言,基因芯片法较罗氏绝对浓度法有快速、灵敏、重复性好等优势。因此,在条件允许的情况下,可应用基因芯片法对结核分枝杆菌耐药性进行检测,这也是对传统药敏试验方法的补充,同时也为临床开展有效、快速的治疗提供有利条件。

参考文献

[1] 苏丽萍,连素琴,李向国,等. 武威市结核病患者膳食多样化水平及营养素摄入状况调查[J]. 现代生物医学进展, 2013,13(33):65-66.
 [2] 金福妹,薛强,邹明强,等. 结核分枝杆菌临床检测技术的研究进展[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2015,32(2):155-

157.

[3] 张学志,陈丽,葛亚萍,等. 比例法与绝对浓度法测试结核分枝杆菌药物敏感性探讨[J]. 中国防痨杂志, 2009,31(3):164-166.
 [4] 李晓非,梁桂亮,普冬,等. 基因芯片技术在分枝杆菌菌种鉴定和结核耐药性检测中的应用及评价[J]. 中国实验诊断学, 2015,19(2):204-207.
 [5] 张俊仙. 基因芯片技术及其在结核分枝杆菌菌种鉴定及耐药性检测方面的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2009,25(21):3718-3720.
 [6] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996,18(3):127-135.
 [7] 孙炳奇,张娟,孙娇,等. 基因芯片技术检测结核杆菌耐药的临床研究[J]. 中国实验诊断学, 2014,18(3):434-436.
 [8] 李晓非,梁桂亮,汪亚玲,等. 2 种快速检测技术在结核分枝杆菌利福平耐药性检测中的应用评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2015,25(10):1661-1672.
 [9] Park H, Song EJ, Song ES, et al. Comparison of a conventional antimicrobial susceptibility assay to an oligonucleotide chip system for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates [J]. J Clin Microbiol, 2006,44(5):1619-1624.
 [10] 姚春艳,张立群,府伟灵. 应用基因芯片技术检测结核分枝杆菌耐药基因[J]. 中华医院感染学杂志, 2010,20(17):1501-1504.
 [11] 王峰,桂静,赵广录,等. 基因芯片检测结核分枝杆菌利福平异烟肼耐药性的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(12):1125-1129.

(收稿日期:2015-10-20 修回日期:2015-12-28)

(上接第 1324 页)

[2] Yan T, Cai R, Mo O, et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China; description of four novel mutations [J]. Haematologica, 2006,91(10):1321-1328.
 [3] 郑敏,罗建明. 广西地区葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症的流行病学调查和基因突变型鉴定[J]. 临床荟萃, 2006,21(11):775-777.
 [4] Elyassi AR, Rowshan HH. Perioperative management of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient: a review of literature[J]. Anesth Prog, 2009,56(3):86-91.
 [5] 居漪,吕元. 能力验证提供者认可准则在检验医学领域中的应用策略探讨[J]. 检验医学, 2015,30(11):1055-1058.
 [6] 唐娟,谭毅. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症检测方法的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2015,8(1):92-96.
 [7] 杨发达,贾璋林,谭桂彩,等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性检

测标本的相关探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010,31(7):639-640.

[8] Sameer YA, Amina SA, Fahima LA, et al. Lower reference limits of quantitative cord glucose-6-phosphate dehydrogenase estimated from healthy term neonates according to the clinical and laboratory standards institute guidelines: a cross sectional retrospective study[J]. BMC Pediatr, 2013,13(1):137.
 [9] Chiang SH, Wu KF, Liu TT, et al. Quality assurance program for neonatal screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2003,34(3):130-134.
 [10] Chiang SH, Fan ML, Hsiao KJ. External quality assurance program for newborn screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency [J]. Ann Acad Med Singapore, 2008,37(3):84-87.

(收稿日期:2015-11-19 修回日期:2016-01-07)