

· 综述 · DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.12.036

## 基因芯片和高分辨率溶解曲线在结核分枝杆菌检测中的应用分析

龙丽娟, 张冬青, 赵 娇 综述, 王海滨<sup>△</sup> 审校

解放军总医院第四医学中心检验科, 北京 100048

**关键词:** 基因芯片; 高分辨率溶解曲线; 结核分枝杆菌**中图分类号:** R446.1**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)12-1716-03

结核病是人类尚未克服的难题,近年来,越来越多耐药菌株的出现更加引起了人们对结核病的重视。目前结核分枝杆菌最常用的检测方法为抗酸染色和罗氏培养法,这些方法虽然成本低廉,但灵敏度低,对结核病的诊断不够及时、灵敏,不能满足临床对结核病诊治的需求。传统的 PCR 技术不能对结核分枝杆菌进行分型和耐药性检测,后续仍需进行复杂的生化实验。而基因芯片技术和高分辨率溶解曲线分析(HRM)技术从基因的角度出发,在菌种鉴定和耐药性检测上都更直接地反映待测标本的菌株信息,两者因其检测速度快、特异度高而引起了广泛关注,本文就二者在结核分枝杆菌检测中的应用进行对比分析。

### 1 基因芯片技术

**1.1 基因芯片概述** 基因芯片技术是利用碱基互补配对原则,将结核分枝杆菌基因组中具有特异性的片段固定于固相载体上,片段的选择一般为保守片段。针对不同的基因,人工合成不同的寡核苷酸片段作为靶基因,标记有荧光分子待测标本扩增后的产物与基因芯片杂交,根据目的基因标记的荧光数量不同,荧光扫描仪检测到的荧光信号强度不同,即可对扩增产物进行分析。基因芯片技术具有高特异性、高通量、高效率等特点<sup>[1]</sup>。

### 1.2 基因芯片在结核分枝杆菌菌种鉴定上的应用

目前临床常用的结核分枝杆菌菌种鉴定的方法为分离培养后进行药敏试验,该方法耗时长、步骤繁琐,不利于阳性标本的及时检出以及及时指导临床用药。而基因芯片技术因其高通量、高特异度的特点,能及时对临床标本进行菌种鉴定、分型以及耐药性检测,对治疗有着重要的指导作用。有研究表明,目前的基因芯片检测系统可以检测 17 种结核分枝杆菌,检测时间一般为 6~8 h,可检测的标本类型包括痰液、脓液、引流液、尿液、胸腔积液、穿刺物等,这些标本均不需要进行结核分枝杆菌的培养<sup>[2]</sup>,可直接进行检测,但不同标本的阳性率有差异,其中以手术过程中的洗肉水检出率最高,其次依次为穿刺液、脓液、组织、引流液、痰液等<sup>[3]</sup>,这就要求临床需根据结核分枝杆菌

不同的感染部位进行标本的取样,如对无菌体液标本的量有一定要求,一般为 5~10 mL。有研究表明,目前基因芯片技术对结核分枝杆菌复合群的鉴定成功率可以达到 100%,对非结核分枝杆菌的鉴定成功率达 95%,对结核分枝杆菌的快速鉴定有重要意义<sup>[4]</sup>。

### 1.3 基因芯片在结核分枝杆菌耐药性检测中的应用

目前临床最常用的抗结核病药物为利福平和异烟肼,基因芯片技术针对结核分枝杆菌对这两种药的耐药基因进行检测,主要是利福平的耐药基因 *rpoB* 和异烟肼的耐药基因 *KatG* 和 *inhA*<sup>[5-7]</sup>。以待测标本分离出来的结核分枝杆菌为模板,以耐药基因的保守序列设计引物及寡核苷酸探针,在引物的末端标记有荧光分子,带有荧光探针的扩增产物与基因芯片上的探针根据碱基互补配对原则进行杂交,根据荧光信号的不同即可推断检测标本的耐药信息。有研究表明,绝大部分利福平的耐药基因 *rpoB* 存在不同部位的突变,传统检测方法不能确定其突变位置,因此限制了其在临床中的应用<sup>[8]</sup>。而异烟肼的耐药基因 *KatG* 均为特定位点的突变,因此从分子水平上更容易检出,从而获得耐药株的耐药信息,目前实验检测出的最常见的异烟肼耐药基因为 *katG315* 和 *inhA-15*<sup>[9]</sup>。但也有研究证实,由于异质性耐药菌的存在,基因芯片技术无法确定其是否存在 *katG* 突变,需要借助测序技术<sup>[10]</sup>。实验表明,目前的基因芯片技术可检测出 *rpoB* 6 个位点的野生型和 13 个突变型, *katG* 1 个位点的野生型以及 *inhA* 基因启动子区的野生型和突变型<sup>[9,11]</sup>。因此可以看出,基因芯片技术并不能检测出结核分枝杆菌全部的耐药基因型,所以它并不能完全替代传统的药敏试验,但因其灵敏度和效率高,可作为传统药敏试验的一种补充手段,尤其是对利福平和异烟肼耐药的菌株的检测<sup>[12]</sup>。

**1.4 基因芯片在结核分枝杆菌检测中的缺陷** 实验研究数据表明,基因芯片检测出的耐药信息与传统药敏试验检测出的耐药信息有一定的差异,部分菌株表现为药敏试验耐药而基因芯片敏感<sup>[13]</sup>,导致这种差异的原因分析如下:(1)基因芯片技术检测的位点有限,

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 1197131586@qq.com。

它主要针对的是保守片段,因此对于部分耐药基因片段,因其缺少相应的检测位点而表现为敏感<sup>[14]</sup>。(2)因为两种检测方法检测的菌株来源不同而造成差异,一般药敏试验的对象为临床分离培养后的纯菌落,而基因芯片技术直接检测标本中的耐药菌,因二者耐药菌的浓度有差异而表现出不同的耐药结果<sup>[15]</sup>。研究显示,以药敏试验结果为标准,对于不同等级的涂片阳性痰液来说,基因芯片对 $\geq 2$ 级抗酸杆菌(+)痰液标本的敏感性优于其他痰液标本<sup>[11]</sup>,由此可推测,相较于直接检测核酸扩增阳性的标本,检测结核分枝杆菌分离株的 DNA 更符合药敏试验的结果。但因其不需要经过培养而直接进行检测,大大缩短了检测时间,由此可见基因芯片技术在临床上有巨大的应用价值。(3)部分基因位点的突变只是使其编码的产物活性减低,而非完全丧失,如 katG315 发生突变后,仍然可以将异烟肼转化为活性异烟酸,只是其编码的过氧化氢或过氧化物酶的活性降低,因此部分转化率降低不是很明显的菌株在基因芯片检测耐药性中表现为敏感<sup>[16]</sup>。(4)一些无菌体液标本或者含菌量较少的标本在检测中有可能出现假性敏感的情况。

## 2 HRM

**2.1 HRM 概述** HRM 是近年来兴起的研究单核苷酸多态性的一种手段,因其检测原理不受检测位点的局限以及其可实现闭管操作从而避免交叉污染而引起广泛关注<sup>[17]</sup>。近年来因结核分枝杆菌分型基因和耐药基因的不断检出,科学家们开展了一系列利用 HRM 来检测结核分枝杆菌耐药基因的研究。因每个核酸分子的 CG 含量、分布、核酸长度均不相同,在升温过程中,通过对饱和染料与 PCR 产物的结合程度进行实时监测,而形成各自的溶解曲线<sup>[18]</sup>。如果发生了基因突变,那么对应碱基会不匹配,结合力减弱,升温时先裂解,溶解温度变低,荧光染料从 DNA 分子上释放,根据荧光强度和温度曲线判断是否存在突变,并且不同的峰型反映了不同的突变位点和突变形式。

**2.2 HRM 在结核分枝杆菌菌种鉴定中的应用** 相比于传统的结核分枝杆菌培养和化学反应,HRM 技术可以更快地对结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌进行鉴定,同时受标本中细菌量的多少和细菌的纯度影响较小<sup>[19-21]</sup>,也避免了较为繁琐的一系列菌种鉴定手段。理论上来说,通过选取不同的靶基因合成不同的引物,可对临床常见的结核分枝杆菌进行分型,并成功得到相应的特征曲线,HRM 和传统罗氏培养法的结果相比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.3 HRM 在结核分枝杆菌耐药性检测中的应用

目前的 HRM 技术主要针对临床上最常见的利福平<sup>[22]</sup>和异烟肼<sup>[23]</sup>进行耐药性检测。研究发现,目前

的 HRM 技术对于利福平的耐药可检测出 12 种突变形式,涉及 7 个基因位点;对于异烟肼的耐药检测出了 katG 基因的 6 种突变形式,inhA 基因的启动子区域 5 种突变形式,ahpC 基因的 6 种突变形式<sup>[23]</sup>。综合目前的研究来看,HRM 技术在耐药性的检测中特异度较高,接近 100%,而灵敏度在 85%以上,有待于进一步提高。

**2.4 HRM 技术在结核分枝杆菌检测中的不足** 目前开展 HRM 技术的医院较少,HRM 技术在结核分枝杆菌的检测上缺少临床数据的支持。HRM 技术的灵敏度需要进一步提高,一方面的原因是目前已知的耐药基因还不够全面,可能会造成耐药基因的漏检<sup>[24]</sup>;另一方面,目前的技术并不能确定具体是哪个非单核苷酸多态性引起的耐药性<sup>[25]</sup>,这就要继续探索相应的突变基因和位点;同时目前的研究大多针对临床常用的一些抗结核病药物进行检测,如利福平和异烟肼,而对其他药物的研究甚少,今后可以扩大药物的种类和检测范围。有研究显示,86%的利福平耐药株同时对异烟肼耐药<sup>[26]</sup>,那么就存在 ropB 的同义突变,而 HRM 技术无法鉴别这种同义突变,数据分析时会出现多种曲线,具体结果还要进一步进行基因测序才能得出<sup>[27]</sup>。另外有研究证明,由于存在杂合耐药菌株和不引起氨基酸改变的基因突变,会造成 HRM 检测结果与药敏试验检测结果不一致的情况<sup>[24]</sup>。

## 3 小 结

作为目前新兴的两项技术,基因芯片和 HRM 都具有高速、高特异度、高通量的特点,随着研究的不断深入,两者在临床中的应用一定会越来越多,对临床治疗的指导作用也会越来越大。两者的不足也有共通之处,即因目前研究水平的问题,两者都不能检测出全部的突变类型,这也是因为结核分枝杆菌的耐药机制复杂,目前未能完全掌握其突变规律。相对于 HRM 技术来说,基因芯片临床上应用更多,技术更加成熟,结果也更容易判读,但因其需要专门的检测设备,成本相对更高<sup>[28]</sup>。而目前 HRM 技术由于更多地应用于科学研究,临床数据相对缺乏,其灵敏度和特异度还有待于进一步研究,但是它真正实现了闭管操作,很大程度上减少了污染。综上所述,基因芯片技术和 HRM 技术虽然都有一些不足,但它们作为新型的检测手段,在结核分枝杆菌检测方面的发展前景较可观,未来可以与实时定量荧光 PCR 技术相结合,对标本同时进行分型和定量分析,节约检测时间,将会对结核病的诊治提供巨大的帮助。

## 参考文献

[1] 李达,王军,杨忠,等.核酸标准物质定值的实验体系研究

- [J]. 计量学报, 2020, 41(11): 1436-1442.
- [2] FANG H, SHANGGUAN Y, WANG H, et al. Multicenter evaluation of the biochip assay for rapid detection of mycobacterial isolates in smear-positive specimens[J]. Int J Infect Dis, 2019, 81: 46-51.
- [3] 刘申, 刘智勇, 黄庆, 等. 基因芯片检测系统在分枝杆菌属鉴定及耐药性分析的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(10): 1960-1961.
- [4] 董启珍, 赵承杰, 吴晓茹. 基因芯片技术在新发涂阳肺结核患者结核杆菌菌种鉴定及药敏试验中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(7): 1026-1027.
- [5] ZAW M T, EMRAN N A, LIN Z. Mutations inside rifampicin-resistance determining region of rpoB gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Infect Public Health, 2018, 11(5): 605-610.
- [6] 孙毅, 胡耀仁, 孙春丽, 等. 基因芯片技术检测分枝杆菌的临床应用研究[J]. 现代实用医学, 2021, 33(5): 581-583.
- [7] 严冬丽. 微阵列基因芯片法检测结核分枝杆菌及其耐药基因的研究[J]. 中国地方病防治, 2021, 36(5): 420-422.
- [8] 林勇明, 黄晓伟, 林淑芳, 等. 不同方法检测利福平耐药结核菌及 MTB ropB 基因突变的对比分析[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2019, 68(2): 123-125.
- [9] TORRES J N, PAUL L V, RODWELL T C, et al. Novel katG mutations causing isoniazid resistance in clinical *M. tuberculosis* isolates[J]. Emerg Microbes Infect, 2015, 4(7): e42.
- [10] COHEN K A, MANSON A L, DESJARDINS C A, et al. Deciphering drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using whole-genome sequencing: progress, promise, and challenges[J]. Genome Med, 2019, 11(1): 45.
- [11] FENG G, HAN W, SHI J, et al. Analysis of the application of a gene chip method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in clinical specimens: a retrospective study[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 17951.
- [12] 李丹, 杜德兵, 吴文燕, 等. 基因芯片技术在分枝杆菌菌种鉴定和耐药性分析中的应用[J]. 检验医学, 2019, 34(2): 167-168.
- [13] 白雪娟, 刘银萍, 张俊仙, 等. 应用基因芯片直接检测结核病患者各类标本中利福平和异烟肼耐药的价值[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(2): 138-144.
- [14] 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.
- [15] 陈建芸, 石玉玲, 李林海, 等. 结核耐药基因的基因芯片检测及临床应用[J]. 生物技术通讯, 2012, 33(4): 589-591.
- [16] 欧维正, 骆科文, 陈峥宏, 等. 贵州地区结核分枝杆菌利福平耐药相关基因 tpoB 突变特征分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(1): 833-835.
- [17] 钟泽澄, 王进, 张师音. 多重 PCR 技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(2): 171-179.
- [18] 梁雪妮, 丁进亚, 王丹, 等. 高分辨溶解曲线技术鉴定常见致病分枝杆菌研究[J]. 华南国防医学杂志, 2016, 36(8): 489-491.
- [19] 李爱芳, 谈小文, 崔晓利, 等. 荧光 PCR 溶解曲线法在非结核分枝杆菌菌种鉴定中的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(7): 664-669.
- [20] 张汇征, 李桓, 张珍, 等. 荧光 PCR 溶解曲线法在检测临床标本结核分枝杆菌及其耐药性中的应用[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(3): 354-356.
- [21] 苏碧仪, 周德旺, 马品云, 等. 荧光 PCR 探针溶解曲线法检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药情况的研究[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2020, 9(4): 245-248.
- [22] 杨敏, 于璐, 吴长新, 等. 高分辨率溶解曲线检测结核分枝杆菌对利福平耐药性研究[J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(3): 161-164.
- [23] 杨彩虹, 杨敏, 于璐, 等. 高分辨率溶解曲线技术用于结核分枝杆菌临床分离株异烟肼耐药性的快速检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(5): 403-412.
- [24] 王智慧, 董雅坤, 池跃朋, 等. 荧光 PCR 探针溶解曲线法检测老年肺结核患者耐药性的价值[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2021, 10(1): 18-22.
- [25] KEIKHA M, KARBALAEI M. High resolution melting assay as a reliable method for diagnosing drug-resistant TB cases: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 989.
- [26] 柯荟, 桂徐蔚, 顾瑾. Xpert MTB/RIF 检测对淋巴结结核的诊断价值[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(10): 1318-1322.
- [27] ANUKOOL U, PHUNPAE P, THARINJAROEN C S, et al. Genotypic distribution and a potential diagnostic assay of multidrug-resistant tuberculosis in northern Thailand[J]. Infect Drug Resist, 2020, 13: 3375-3382.
- [28] 钟业腾, 吕志辉, 林翀, 等. 基因芯片法与线性探针法对痰标本中结核分枝杆菌检测的应用价值[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(4): 283-288.

(收稿日期: 2021-09-16 修回日期: 2022-01-22)