

利用基因芯片检测结核分支杆菌及其利福平耐药性的研究

何敏 曾尔良 郑艳燕 汤卓 卢祥婵 孙碧辉 许丁空 张志勇 杨莉

【摘要】 目的 探讨结核杆菌耐利福平(RFP)检测基因芯片在结核病诊断及其耐药性检测中的应用价值。方法 采用结核杆菌耐RFP芯片对35株RFP耐药的临床分离菌株、102例肺结核患者、27例非结核病的其他患者的痰标本中的结核杆菌及其RFP耐药性进行了检测,基因芯片检测结果与痰涂片、细菌培养及结核杆菌标准化药敏试验结果比较。结果 结核杆菌耐RFP检测芯片检测35株耐药株,有33株判定为RFP耐药株,与传统药敏试验结果的符合率为94.29%。对27份其他患者的痰液标本进行结核杆菌检测,特异性为92.59%。对102份结核患者痰标本中结核杆菌进行检测,痰涂片法阳性率35.29%(36/102),细菌培养法阳性率28.43%(29/102),基因芯片法阳性率77.45%(79/102)。传统的药敏试验报告102份痰标本仅29份培养出结核分支杆菌,其中8份RFP耐药株,而基因芯片法检测102份痰标本中发现20份耐RFP结核杆菌。主要基因突变位点为531、526和516。结论 采用结核杆菌耐RFP检测芯片检测结核杆菌及RFP耐药性具有快速简便、特异性高的特点。

【关键词】 结核杆菌;耐药;基因芯片

Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin-resistant strains by gene-chips HE Min*, ZENG Er-liang, ZHENG Yan-yan, TANG Zhuo, LU Xiang-chan, SUN Bi-hui, XU Ding-kong, ZHANG Zhi-yong, YANG Li. *Medical Scientific Research Center, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective To evaluate the gene-chip detecting rifampin-resistance *Mycobacterium tuberculosis* applied in TB diagnosis and drug-resistant detection. **Methods** *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin-resistant strains among 35 rifampin-resistance isolated strains and 102 sputa specimens from TB patients, 27 sputa specimens from other patients were examined the gene-chips. Results obtained were compared with sputum examination, bacteriological culture and standard drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis*. **Results** Thirty-five rifampin-resistance strains were detected by gene-chips and 33 were identified as rifampin-resistance strains and the concordance with the traditional drug susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* was 94.29%. Twenty-seven sputa specimens from other patients were examined *Mycobacterium tuberculosis* by the gene-chips, 2 were positive, the detection specialty was 92.59%. Using three methods detecting *Mycobacterium tuberculosis* among 102 sputa specimens the positive rate respectively was, sputum examination 35.29% (36/102), bacteriological culture 28.43% (29/102), gene-chip 77.45% (79/102). Among 102 sputa specimens only 29 examined *Mycobacterium tuberculosis* by the traditional drug susceptibility test and 8 were rifampin-resistant strains. While using gene-chip, there were 20 among 102 sputa specimens identified as rifampin-resistance strains. Among total 55 rifampin-resistance strains detected by the gene-chips, the most frequent mutations were those associated with codon 531 (23 of 55; 41.8%), 526 (15 of 55; 27.27%) and 516 (9 of 55; 16.36%). **Conclusion** Results showed that this was a rapid, simple and highly specific method when using gene-chip to detect *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin-resistant strains.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Drug-resistance; Gene-chip

中国是世界上结核病负担最重的22个国家之

一,进入21世纪,中国的结核病流行趋势令人关注,2000年全国结核病流行病学抽样调查显示,我国结核病疫情有如下特点:高患病率、高耐药率、高死亡率、高感染率、低递减率、病例发现率低等特点^[1]。因而如何控制传染源、尽早发现新病例、快速而准确地检测结核分支杆菌的耐药性,成为结核病防治工作中的当务之急。由于基因芯片具有高通量、大规模、高度并行性、快速高效、高灵敏度、高度自动化等

基金项目:广西科技厅资助项目(桂科攻0235024-27)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学医学科学实验中心(何敏);上海博星基因芯片有限公司(曾尔良);广西医科大学公共卫生学院(郑艳燕、张志勇、杨莉);南宁市第四人民医院(汤卓、卢祥婵、孙碧辉、许丁空)

特点,因而将基因芯片技术与结核杆菌及其耐药性检测结合起来,成为目前研究的一个热点。

材料与方 法

1. 标本来源 :35 株结核分支杆菌临床分离株,102 份临床诊断为“肺结核”住院患者的晨痰标本及 27 份非结核病其他患者的痰液标本,由南宁市第四人民医院提供。按全国结核病细菌学检验标准化规程进行痰涂片、分支杆菌培养、菌种鉴定和药敏试验。

2. 主要试剂和仪器 :结核杆菌耐利福平(RFP)芯片检测基因芯片(上海博星基因芯片有限责任公司产品),Taq 酶(日本宝生物产品);多通道 PCR 仪(美国 MJ 公司产品);低温高速离心机(美国 BECKMAN COULTER 产品);杂交炉(UK 公司产品);芯片扫描仪 Genep ix 4000B(美国 Axon 公司产品)。

3. 结核杆菌耐 RFP 检测芯片检测结核分支杆菌及其 RFP 耐药性:

(1) 标本处理 :①痰标本处理 :1 倍体积痰标本中加入 7 倍体积 1 mol/L 的 NaOH 在 37℃ 液化 2 h;取 1 ml 经 13 000 r/min 离心 10 min,去上清液,沉淀用 1 ml ddH₂O 溶解混匀,再经 13 000 r/min 离心 10 min,重复水洗一次后,去上清,沉淀用 200 μl 的裂解液处理,另加 20 mg 左右的吸附剂,煮沸 15 min 后取出,震荡 3 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清用于 PCR 反应。②培养分离菌标本的处理 :菌标本用 1 ml ddH₂O 溶解混匀,13 000 r/min 离心 10 min,去上清,沉淀用 100 μl ddH₂O 溶解混匀,用 700 μl 1 mol/L NaOH 37℃ 液化 2 h,13 000 r/min 离心 10 min,去上清,重复水洗一次后,沉淀用 200 μl 裂解液处理,另加 20 mg 左右吸附剂,煮沸 15 min,震荡 3 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清用于 PCR 反应。以下涉及到引物及其产物的操作步骤必须在避光条件下(有红灯的暗室内)进行。

(2) PCR 反应 :①在 25 μl 的反应体系中含引物 I 4 μl,模板 50 ng(标本处理后取上清 2 μl),1 × PCR 缓冲液,MgCl₂ 1.5 mmol/L,dNTPs 0.2 mmol/L 及 2 U Taq 酶;PCR 程序 :95℃ 3 min,95℃ 10 s,60℃ 10 s,72℃ 20 s,15 个循环,72℃ 延伸 3 min。②取上述 PCR 产物做模板,进行下个 PCR 反应,在 25 μl 的反应体系中含引物 II 4 μl,模板 2 μl(上述 PCR 产物),1 × PCR 缓冲液,MgCl₂ 1.5 mmol/L,dNTPs 0.2 mmol/L

及 2 U Taq 酶;PCR 程序 :95℃ 3 min,95℃ 10 s,72℃ 15 s,40 个循环,72℃ 延伸 3 min。③在 25 μl 的反应体系中含引物 III 4 μl,模板 50 ng(标本处理后取上清 2 μl),1 × PCR 缓冲液,MgCl₂ 1.5 mmol/L,dNTPs 0.2 mmol/L 及 2 U Taq 酶;PCR 程序 :95℃ 3 min,95℃ 10 s,60℃ 10 s,72℃ 10 s,40 个循环,72℃ 延伸 3 min。

(3) PCR 产物沉淀 :将②及③ PCR 产物混合,加 4 μl 核酸沉淀液,4 μl NaAc(pH 值 5.2)和 80 μl 的无水乙醇,混匀,-20℃ 放置 30 min;在 13 000 r/min 和 4℃ 条件下离心操作 15 min,完成后小心吸掉上清液,抽干或烘干。

(4) 杂交 :加 5 μl 双蒸水溶解沉淀,加阳参液 1 μl 和 7 μl 的经 60℃ 预热的杂交液,混匀,94℃ 变性 3 min 后置冰上,全部转移到芯片的点样区域,加盖玻片,杂交舱内加几滴水,将芯片放入杂交舱,密封杂交舱,48℃ 恒温 1 h。

(5) 洗片及扫描 :取出芯片,用 1 × 洗脱液冲掉盖玻片,然后放入盛有 1 × 洗脱液的染缸 5 min,去离子水冲洗 2 次。将芯片室温下避光干燥。用 Genep ix 4000B 在 70~90 扫描强度下扫描,根据配套软件分析杂交结果。

结 果

1. 基因芯片的点样矩阵分布 :基因芯片的点样矩阵分布结果如表 1 所示。

表 1 基因芯片点样矩阵分布

点样探针(重复 5 点) 阳性外参					
511N1	513M2at	516N6	522M11tc	526M11ca	534N1
511N6	513M3gc	516M3at	522M3tc	526M2at	534Mga
511M3gc	515N3	516M6gt	526N1	526M1cgat	538N
511M3tc	515M1gt	516M1ag	526M1cg	531N2	538Mtc
511M4tc	515M4gt	516M4ag	526M3ac	531M4cg	518N
513N1	515M1ga	522N5	526Mag	531M3ct	518Mat
513M1ac	515Mag	522M3ct	526Mct	531Mca	400N

注 :N 表示野生型探针,如 511N 表示能与 511 位点未发生突变的 PCR 产物完全配对杂交的探针;M 表示突变型探针,如 511Mgc 表示该探针与 511 位点发生 G→C 突变的 PCR 产物完全配对杂交;阳性外参指芯片上固定的植物基因片段。400N 代表结核分支杆菌的一段多拷贝基因。

2. 基因芯片的扫描图谱 :在进行杂交信号分析时,突变型杂交信号与野生型比较,信号强度超过野生型的 2 倍以上才能记为阳性。在图 1A 中,516M1ag 虽然也出现杂交信号,但与 516 野生型比

较,信号强度弱,所以不能判为阳性。因而图 1A 所示菌株仍为 RFP 敏感株。

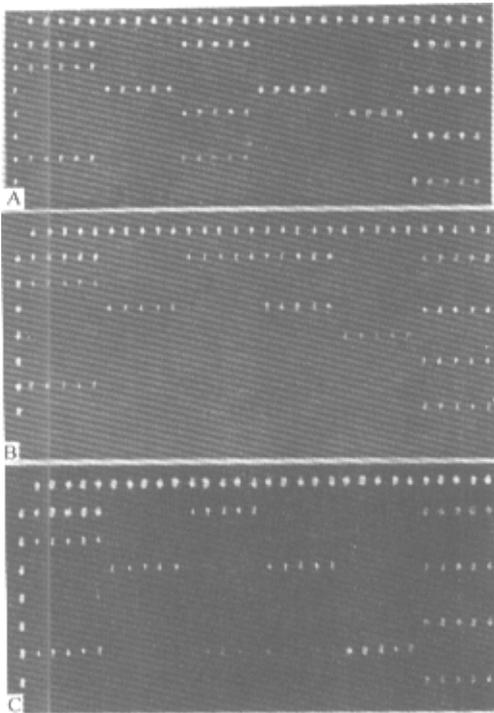


图1 RFP 敏感株、耐药株基因芯片扫描图谱
A :RFP 敏感株(正常标本);B :RFP 耐药株(522M11tc);C :RFP 耐药株(531M3ct)

图1 RFP 敏感株、耐药株基因芯片扫描图谱

3. 结核杆菌耐 RFP 芯片检测临床分离菌株 35 株临床分离菌株,按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分支杆菌培养、菌种鉴定和药敏试验,证实为 RFP 耐药株,利用结核杆菌耐 RFP 芯片对该 35 株临床分离菌株进行检测,结果有 33 株判定为 RFP 耐药株,与传统药敏试验结果比较,基因芯片法检测符合率为 94.29%。

4. 结核杆菌耐 RFP 芯片检测痰标本中的结核杆菌 :102 例临床诊断为“肺结核”住院患者的晨痰标本,按全国结核病细菌学检验标准化规程进行痰涂片、分支杆菌培养,同时采用结核杆菌耐 RFP 芯片检测痰标本中的结核杆菌。检测结果如表 2 所示,基因芯片检测痰标本中结核分支杆菌的阳性率高于痰涂片法和细菌培养法。对 27 份非结核患者的痰液标本进行结核杆菌检测,2 例阳性,该芯片用于结核杆菌检测的特异性为 92.59%。

5. 结核杆菌耐 RFP 芯片检测痰标本中的结核杆菌 RFP 耐药性 :102 份临床诊断为“肺结核”住院患者的晨痰标本,按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分支杆菌培养和药敏试验,结果药敏试验

报告有 29 份培养出结核分支杆菌,其中发现 8 份耐 RFP 结核杆菌,耐药率 27.59%。而基因芯片法检测 102 份痰标本中 79 份 PCR 阳性中发现 20 份耐 RFP 结核杆菌。

表2 3种方法检测 102 份痰标本中结核分支杆菌的结果比较

方法	结核分支杆菌检测			
	标本份数	阳性份数	阴性份数	阳性率(%)
痰涂片	102	36	66	39.29
细菌培养	102	29	73	28.42
基因芯片	102	79	23	77.45

6. 耐药结核杆菌的基因突变型分析:利用结核杆菌耐 RFP 芯片检测到的 55 株耐药菌株,其基因突变类型如表 3 所示。531 位点突变占 41.81%(23/55),526 位点突变占 27.27%(15/55),516 位点突变占 16.36%(9/55),522 位点突变占 7.27%(4/55),511 位点突变占 3.63%(2/55),513 位点突变占 3.63%(2/55)。

表3 55 株耐药菌株基因突变型

标本来源	菌株数	突变基因型	标本来源	菌株数	突变基因型	
痰标本	4	531M3ct	RFP 耐药株	2	516M6gt	
	3	531Mca		1	516M6gt	
	2	531M4cg		2	522M11tc	
	3	526M1cg		1	522M3ct	
	2	526M3ac		4	526M1cg	
	1	516M3at		3	526M3ac	
	1	516M6gt		2	526Mag	
	1	516M1ag		1	526Met	
	2	513M1ac		4	531M4cg	
	1	522M11tc		5	531M3ct	
	RFP 耐药株	2		511M3tc	5	531Mca
		3		516M3at	合计	55

讨 论

药敏检测目的难以圆满实现的主要原因在于药敏检测方法本身的缺陷。主要表现为耐药性界限不统一,生长依赖性的药物敏感试验需要较长时间,检测精度和临床实用性要求尚难两全。随着现代科学对缓慢生长本质的逐步认识,人们现在的努力集中在“早期”检出,如微孔法、BACTEC、噬菌体荧光素酶法、氧化还原酶活性检测等^[2]。但是,这些方法也依赖于菌的生长,仍难以满足真正快速检测的需要。

1998 年, Cole 等报道了结核分支杆菌的基因全序列,随着对结核分支杆菌分子遗传学研究的深入,其耐药性的分子机制得到越来越多的阐明。近年

来,国内外学者采用分子遗传学方法研究了主要抗结核药物作用的分子机制及其耐药性的分子基础。已确定主要为基因突变引起耐药性的抗结核药物有异烟肼、RFP、链霉素、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、丙硫异烟胺、喹诺酮类、甲红霉素等。而每一种耐药性均涉及到结核杆菌一个或多个基因的突变、缺失或颠换等^[3]。耐 RFP 主要是由于药物作用靶分子 RNA 聚合酶 β 亚单位 (rpoB) 的突变。在结核分支杆菌耐 RFP 分离株中,93%~95%左右 rpoB 序列内的不同位点存在多种突变,一般发生在 507~533 位^[4]。

基因芯片技术始创于 20 世纪 90 年代初,是目前分子生物学最前沿的方法。基因芯片是指将大量不同的生物信息分子(如寡核苷酸、DNA 或 cDNA 探针等)以高度密集的方式(通常每平方米点阵密度高于 400),有序地固定在固相支持物(通常为玻璃)上而形成微阵列。当荧光标记的靶分子与芯片上的探针分子相结合后,用激光共聚焦荧光扫描或电荷偶联摄像机对荧光信号的强度进行检测,从而对杂交结果进行量化分析,所以可一次性对标本大量序列进行检测和分析,其最大优势是能同时分析成千上万个基因。目前结核病的五个一线抗结核药物的耐药相关基因都已被发现,利用芯片技术可将针对所有这些突变的探针集成到一张芯片上,只需少量标本进行一次杂交,即可获得某一菌株对所有五个一线抗结核药物的敏感性结果。

由博星基因有限公司提供的结核杆菌耐 RFP 检测芯片包含了 507、511、513、515、516、522、526、531 与耐 RFP 相关的 rpoB 基因密码子突变,以及新发现的 500、502、505、506、518、534、538 等密码子的突变位点。为验证该芯片,对 35 株传统药敏试验报告为 RFP 耐药株的临床分离菌株,进行芯片检测,结果有 33 株判定为耐药株,与传统药敏试验结果比较,基因芯片法检测符合率为 94.29%。2 株检测结果与传统药敏试验结果不符,是否由于该菌株存在新的异常突变位点,还有待证实。对 102 份患者的痰标本中结核分支杆菌及其利福平耐药性检测中,传统药敏试验发现 8 份耐 RFP 结核杆菌,基因芯片法检测发现 20 份耐 RFP 结核杆菌。尽管有学者认为结核杆菌的基因型与其表型不完全一致^[5],但由于 RFP 耐药性检测芯片在 24 h 内可完成 RFP 耐药性的检测,不依赖于菌的生长,因而 RFP 耐药性检测芯片是一种快速、简便的方法^[6,7]。同时利用耐 RFP

芯片可以达到快速检测耐药菌株基因突变类型的目的,在发现的 55 株 RFP 耐药菌株中,以 531、526、516 位点突变为主,这与 Garcia 等^[8]的结果相似。

本研究中所采用的结核杆菌耐 RFP 检测芯片,除了能够检测结核杆菌耐 RFP 的 rpoB 基因突变,还设计了针对结核杆菌特异性探针,既提高了检测的特异性,又能将结核杆菌感染和其他分支杆菌感染区分。因此该芯片也可作为检测结核杆菌感染的独立产品。对 102 例肺结核患者晨痰标本的检测结果可以看出,基因芯片法检测的阳性率要远高于痰涂片法和痰细菌培养法。王颖莹等^[9]应用压电基因传感器芯片检测结核分支杆菌 DNA 阳性率为 42.5%,高于 PCR 法 36.8% 和涂片法的 17%,认为芯片技术是一种简便、快速的结核分支杆菌检测方法。2000 年流行病学调查(流调)结果显示,在我国结核患者发现率低,全国有近 2/3 的活动性患者,近 3/5 的涂阳患者未被发现。由于流调中主要采用的是涂片法,而抗酸染色镜检阳性率仅为 30% 左右,因而结核杆菌耐 RFP 检测芯片应用于检测结核杆菌感染,有助于提高患者发现率。

参 考 文 献

- 1 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告. 中国防痨杂志, 2002, 24: 65-108.
- 2 潘毓萱. 有关结核分支杆菌耐药性测定几个问题的看法. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23: 75-76.
- 3 李燕, 李明远. 耐药结核分支杆菌检测方法的研究进展. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2000, 21: 190-192.
- 4 庄玉辉. 结核病实验室诊断新技术研究应用中值得重视的问题. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22: 133-134.
- 5 Rinder H, Mieskes KT, Loscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2001, 5: 339-345.
- 6 Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. J Clin Microbiol, 2001, 39: 2531-2540.
- 7 Mikhailovich VM, Lapa SA, Gryadunov DA, et al. Detection of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization and polymerase chain reaction on a specialized TB-microchip. Bull Exp Biol Med, 2001, 131: 94-98.
- 8 Garcia L, Alonso-Sanz M, Rebollo MJ, et al. Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol, 2001, 39: 1813-1818.
- 9 王颖莹, 府伟灵, 张伟, 等. 应用压电基因传感器芯片检测结核分支杆菌 DNA. 中华医院感染杂志, 2000, 10: 418-420.

(收稿日期 2002-10-20)

(本文编辑:尹廉)