

PCR 熔解曲线法筛查结核分枝杆菌链霉素和乙胺丁醇耐药性

王峰 胡思玉 桂静 崔运勇 刘小立 李庆阁

【摘要】 目的 利用PCR熔解曲线法快速筛查结核分枝杆菌(MTB)对链霉素、乙胺丁醇耐药性,并与药敏试验结果比较,评价其应用价值。方法 收集深圳市2007—2009年331株MTB临床分离株,应用PCR熔解曲线法检测*embB*基因306、378~380、406和497、*rpsL*基因43、88及*rrs*基因513~517、905~908位点耐药突变,并与药敏试验结果比较。结果 以药敏试验结果为标准,PCR熔解曲线法检测MTB链霉素耐药突变的敏感性为78.6%、特异性为90.1%、准确性为86.7%;检测MTB乙胺丁醇耐药突变的敏感性为83.0%、特异性为93.3%、准确性为91.8%。PCR熔解曲线法与药敏试验检测结果具有很好的一致性。结论 PCR熔解曲线法能够快速、特异地检测MTB对链霉素、乙胺丁醇耐药突变,可用于临床筛查。

【关键词】 结核分枝杆菌; 耐药性; 链霉素; 乙胺丁醇

A rapid screening program on the resistance to streptomycin and ethambutol in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by PCR melting curve analysis WANG Feng¹, HU Si-yu², GUI Jing¹, CUI Yun-yong¹, LIU Xiao-li¹, LI Qing-ge². 1 Department of Pathogenic Laboratory, Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China; 2 Engineering Research Center of Molecular Diagnostics, Ministry of Education, School of Life Science, Xiamen University
Corresponding authors: LIU Xiao-li, Email: liux136@126.com; LI Qing-ge, Email: qgli@xmu.edu.cn
This work was supported by a grant from the National Science and Technology Support Projects for the "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2008ZX10003-004).

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effects of PCR melting curve analysis assay on a rapid screening program regarding the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) clinical isolates to streptomycin and ethambutol. **Methods** A total of 331 clinical isolates of MTB had been collected since 2007-2009 in Shenzhen. Mutations at codon 306, 378-380, 406 and 497 of *embB* gene, codon 43, 88 of *rpsL* gene, and 513-517, 905-908 region of *rrs* gene were detected by PCR melting curve analysis. Results were compared with that of conventional drug susceptibility test. **Results** Compared to drug susceptibility test, sensitivity, specificity and accuracy for streptomycin resistance were 78.6%, 90.1% and 86.7%, respectively while 83.0%, 93.3% and 91.8%, respectively for ethambutol resistance detected by PCR melting curve analysis. PCR melting curve method was in good agreement with drug susceptibility test. **Conclusion** PCR melting curve analysis on genetic regions associated with resistance to streptomycin and ethambutol seemed to be a rapid, specific and closed-tube method so it could be used for detection of streptomycin and ethambutol resistance in MTB.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; Streptomycin; Ethambutol

耐药结核病是目前我国结核病防治工作面临的最重要挑战之一^[1]。链霉素和乙胺丁醇是临床上常用的两种抗结核治疗一线药物,2002—2007年全球

新发病例中链霉素和乙胺丁醇耐药率分别为10.9%和2.5%,在复治病例中更达到20.1%和10.3%^[2]。传统的结核分枝杆菌(MTB)表型药物敏感性测试需要2~4周,易延误耐药结核病患者的诊治。快速的分子生物学方法对于及时诊断、防止耐药结核病的传播具有重要意义。本研究用实时荧光定量PCR熔解曲线法检测MTB链霉素、乙胺丁醇耐药基因主要突变,并与传统药敏试验进行比较,评价其快速筛查链霉素、乙胺丁醇耐药性的效能及临床应用价值。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.05.018

基金项目:国家“十一五”科技重大专项(2008ZX10003-004)

作者单位:518020 深圳市慢性病防治中心病原检验科(王峰、桂静、崔运勇、刘小立);厦门大学生命科学学院分子诊断教育部工程研究中心(胡思玉、李庆阁)

通信作者:刘小立, Email: liux136@126.com; 李庆阁, Email: qgli@xmu.edu.cn

材料与方 法

1. 菌株:331株MTB临床分离株来源于2007—2009年深圳市耐药监测项目、全国耐药基线调查项目和深圳市慢性病防治中心临床门诊患者痰培养物,经对硝基苯甲酸(PNB)、2-羧酸胍嘌呤(TCH)培养基初筛和PCR鉴定为MTB。标准菌株H₃₇Rv购自中国药品生物制品检定所。

2. 方法:

(1)实时荧光定量PCR熔解曲线法检测链霉素、乙胺丁醇耐药基因突变:MTB临床分离株经改良罗氏培养基培养2~3周后取适量菌落于300 μl纯水中,100℃水浴灭活20 min,14 000 r/min离心10 min,取上清液-20℃保存作为DNA模板。链霉素、乙胺丁醇耐药突变筛查均分2管进行,采用双色实时荧光定量PCR熔解曲线法检测。链霉素耐药基因突变检测:针对*rpsL*和*rrs*基因突变位点,设计A、B两种反应体系,各含2条探针。A体系检测*rpsL*基因43和88位密码子突变,B体系检测*rrs*基因513~517和905~908位点突变。反应体系均含20 μl PCR反应液和5 μl DNA模板。PCR在美国伯乐CFX96实时荧光定量PCR仪上进行,扩增分两步,先是降落PCR:95℃10 s,70℃20 s(每个循环下降1℃),76℃25 s,10个循环;然后95℃10 s,60℃20 s,75℃25 s,30个循环。扩增产物与探针结合熔解分析程序为95℃2 min,40℃2 min后40~80℃升温,升温阶段每0.5℃同时采集6-羧基荧光素(FAM)和四羧-6-羧基荧光素(TET)通道荧光信号。野生型在反应体系A中FAM通道熔点(T_m)=(57±1)℃,TET通道T_m=(65±1)℃。在反应体系B中FAM通道T_m=(63.5±1)℃,TET通道T_m=(60.0±1)℃。如果探针覆盖位点发生突变,与相应探针结合能力下降,熔解曲线T_m也会随之下降。当4个通道中样本T_m与野生型对照一致时判定为野生型,菌株对链霉素敏感;4个通道中任一通道样本熔解温度低于野生型≥2℃则认为菌株对链霉素耐药。乙胺丁醇耐药基因突变检测与链霉素耐药检测类似:设计A、B两种反应体系,分别检测*embB*基因306、378~380和406、497位点突变。野生型在A管中FAM通道熔解曲线峰T_m=(66.5±1)℃,TET通道T_m=(61.5±1)℃。B管中FAM通道T_m=(64.5±1)℃,TET通道T_m=(67.5±1)℃。4个通道中任一通道样本T_m值低于野生型≥2℃判定为突变型,菌株对乙胺丁醇耐药。

(2)链霉素、乙胺丁醇药物敏感性测定(药敏试验)及耐药基因突变测序:参照世界卫生组织/国际防痨和肺病联合会(WHO/IUATLD)标准^[3],以H₃₇Rv作为敏感对照,1%比例法测定菌株链霉素、乙胺丁醇敏感性。链霉素、乙胺丁醇均为美国Sigma-Adrich公司产品。将链霉素、乙胺丁醇药敏试验结果与突变检测结果不一致的菌株,重新进行药敏试验。同时分别扩增*embB*、*rpsL*和*rrs*基因片段,送上海Invitrogen公司测序,测序结果与H₃₇Rv相应基因位点序列进行比对与突变分析。

3. 统计学分析:应用SPSS 17.0软件进行统计分析,以药敏试验结果作为标准,评价PCR熔解曲线法的敏感性、特异性和准确性,Kappa检验评价PCR熔解曲线法和表型药敏结果的一致性。

结 果

1. PCR熔解曲线法检测链霉素耐药性:经药敏试验测定,331株MTB临床分离株中,链霉素耐药98株、敏感233株。以药敏试验结果为标准,PCR熔解曲线法检测敏感性为78.6%、特异性为90.1%、准确性为86.7%,二者具有很好的一致性(表1)。对PCR熔解曲线法检测链霉素耐药性与药敏试验结果不一致的44份样本*rpsL*、*rrs*基因测序,结果见表2。药敏试验确定的敏感菌株中,23株经PCR熔解曲线法检测发现耐药基因突变,测序表明靶位点全部发生突变,其中1株发生*rpsL*88AAG→CAG及*rrs*517C→T双位点突变。药敏试验确定的耐药菌株中,21株经PCR熔解曲线法检测判定为敏感,测序表明*rpsL*、*rrs*基因检测区域均未发生突变。

表1 PCR熔解曲线法检测MTB链霉素、乙胺丁醇耐药性的敏感性、特异性和准确性

药物	PCR熔解曲线法	药敏试验		敏感性 (%)	特异性 (%)	准确性 (%)	Kappa值
		R	S				
链霉素	R	77	23	78.6	90.1	86.7	0.68
	S	21	210				
乙胺丁醇*	R	39	19	83.0	93.3	91.8	0.69
	S	8	264				

注:S:敏感;R:耐药;*1株菌无结果

2. PCR熔解曲线法检测乙胺丁醇耐药性:经药敏试验测定,331株MTB临床分离株中,乙胺丁醇耐药47株、敏感283株,1株无结果。以药敏试验结果为标准,PCR熔解曲线法检测敏感性为83.0%、特异性为93.3%、准确性为91.8%(表1)。共有27株菌经两种方法检测后显示结果不一致,*embB*基因测序结果比较见表3。药敏试验确定的敏感菌株中,19株

表2 PCR熔解曲线法与药敏试验检测链霉素耐药性不一致样本耐药基因测序结果

药敏试验	菌株数	PCR熔解曲线法	基因、突变位点及类型 (菌株数)
S	23	R	<i>rpsL43AAG</i> → <i>AGG</i> (10) <i>rpsL88AAG</i> → <i>AGG</i> (2) <i>rpsL88AAG</i> → <i>CAG/rrs517C</i> → <i>T</i> (1) <i>rrs514A</i> → <i>C</i> (6) <i>rrs517C</i> → <i>T</i> (2) <i>rrs906A</i> → <i>G</i> (2)
R	21	S	-(21)

注:同表1;“-”为无突变

表3 PCR熔解曲线法与药敏试验检测乙胺丁醇耐药性不一致样本*embB*基因测序结果

药敏试验	菌株数	PCR熔解曲线法	<i>embB</i> 基因突变位点及类型 (菌株数)
S	19	R	304 CTG>TTG(1) 306 ATG>ATA(2) 306 ATG>ATC(1) 306 ATG>GTG(4) 378 GAG>GCG(8) 406 GGC>TGC(1) 495 GCC>CCC(1) 497 CAG>CAC(1)
R	8	S	319 TAT>TGT(1) 354 GAC>GCC(2) -(5)

注:同表1

经PCR熔解曲线法检测为耐药,测序结果显示这些标本全部在*embB*基因检测区域发生突变。药敏耐药试验确定的耐药菌株中,8株经PCR熔解曲线法检测未检出耐药,测序显示5株*embB*检测区段无突变,3株在检测靶位点外的位点发生点突变。

讨 论

目前全球只有7%的耐多药结核病(MDR-TB)病例得到确诊和通报^[4]。WHO建议常规耐药结核病规划中应开展乙胺丁醇、链霉素和吡嗪酰胺的药敏监测^[5]。传统的以培养为基础的药敏试验方法检测周期长、费用较高且需要具备良好的生物安全防护条件,在基层结核病实验室难以开展。

随着对耐药分子机制的认识,各种检测耐药基因突变的基因型药敏试验方法正在得到开发和运用。目前研究多针对利福平、异烟肼的耐药基因^[6,7]。但有关乙胺丁醇和/或链霉素耐药性快速分子诊断的研究尚不多。目前报道的有反向斑点杂交^[8,9]、PCR-限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)^[10]、单链构象多态性分析(PCR-SSCP)等^[11,12],这些方法操作繁琐、耗时较长、容易产生污染,限制其在临床检

测和耐药监测中的应用。最近报道用一种环介导等温扩增-限制性酶内切-酶联免疫吸附系统,检测*rpsL*基因43、*embB*基因306和497位点突变,实现了单管操作,但需要对PCR产物开盖后进行多步骤处理^[13]。

PCR探针熔解曲线分析通过监测杂交荧光信号获得相关信息,实现真正的闭管操作,避免PCR后处理可能导致的扩增产物污染。本研究采用该技术检测MTB乙胺丁醇和链霉素耐药基因突变,扩增和结果判定在同一反应管内完成,简化了操作步骤,2~3h即可完成检测,且每次可同时检测多达45份标本。检测结果通过设备分析生成的熔解曲线Tm值进行判定,直观简单,减少人为因素的影响。

乙胺丁醇耐药与*embB*基因多个位点突变高度相关,其中30%~68%的耐药菌株中发现306位点突变^[14,15],因此*embB*基因306位点成为最常用的检测位点。Hain公司新推出的广泛耐药结核病检测试剂盒GenoType MTBDRsl设计针对*embB*基因306位点ATG/ATA(M306I)和ATG/GTG(M306V)2类突变探针,检测乙胺丁醇耐药突变,初步评价对耐药菌株检测的敏感性在65%~70%之间^[14,15]。本研究加入*embB*基因378~380、406、497位点。测序结果表明乙胺丁醇耐药菌株*embB*基因306位点突变至少有4种类型:ATG>ATA、ATG>ATC、ATG>ATT和ATG>GTG(数据未列出)。同时还发现多株耐药菌株406、497位点发生突变,但306位点无突变。以药敏试验作为标准,PCR熔解曲线法检测乙胺丁醇耐药的敏感性达83.0%。27份与表型药敏结果不一致的样本中,8份经药敏试验判定为耐药的样本经熔解曲线法判定为敏感,其中3份标本*embB*基因发生突变,其余5份测序无突变,可能是其他耐药基因发生突变,或者其他耐药机制造成菌株耐乙胺丁醇,提示进一步优化补充检测靶位点可能会提高检测敏感性;19份经药敏耐药试验判定为敏感但经熔解曲线法判定为耐药,测序证实这些菌株均发生*embB*突变。补充利福平、异烟肼药敏试验,发现其中16株为MDR或单耐异烟肼,2株单耐链霉素,而4种药全敏感只有1株。这种*embB*基因突变与乙胺丁醇耐药表型不一致,而与菌株耐其他抗结核药相关的结果同有关报道类似^[16],可能是*embB*突变引起乙胺丁醇最低抑菌浓度(MIC)值的变化,但菌株对乙胺丁醇耐药性的轻度或中度变化在药敏试验中可能得到不同的结果。另外,可能与菌株的遗传背景有关,因此*embB*也可以作为检测耐多药菌株的候选分子标

志^[17]。*embB* 基因 304 和 495 位点突变尚未见文献报道, 是否与乙胺丁醇耐药相关尚待进一步研究。

rpsL 基因突变是 MTB 对链霉素耐药的主要机制, 其中最常见的是 43 和 88 位点突变, 16S rRNA 编码基因 *rrs* 突变也介导对链霉素的耐药性。耐药菌株中 *rpsL* 和 *rrs* 基因突变率在不同研究中差别较大, 可能与地域或菌株基因型相关^[18]。但主要的耐药突变类型基本得到认同, 主要有 *rpsL* 基因 43 位密码子的 K43R (AAG→AGG)、88 位密码子的 K88Q (AAG→CAG) 或 K88R (AAG→AGG) 突变, *rrs* 基因的 513 (A→T)、513 (A→C)、516 (C→T)、906 (A→C)、512 (C→T) 等。本研究通过联合检测 *rpsL* 基因 43 和 88 位、*rrs* 基因 513~517 和 905~908 位点等多个位点突变, 检测敏感性达到 78.6%、特异性为 93.3%。两种检测方法结果不一致的 44 份样本中, 21 株表型耐药菌株经熔解曲线分析未能筛出, 经测序验证在以上位点均无突变, 可能发生其他基因的耐药突变, 或者耐药由外排泵增强和/或其他未知耐药机制引起^[19]; 23 株药敏试验敏感菌株经熔解曲线法检出突变 (全部得到测序证实), 与表型不一致的原因可能是耐药基因突变引起低水平耐药, 此外分子检测仅检测基因位点突变, 而表型药敏试验结果是药物、细菌、环境多因素共同作用的结果。而且药敏试验本身测验精度因药物而异。尽管两种检测方法检测结果存在不一致, 由于分子诊断试验筛查有限的基因位点即可获得较好的敏感性和特异性, 而且快速稳定、重复性好, 用于筛查耐药结核病是耐药结核病控制很好的选择^[20]。

参 考 文 献

[1] Ministry of Health of the People's Republic of China. The Base-line Survey of the National Drug-resistant Tuberculosis (2007-2008). Beijing: People's Medical Publishing House, 2010. (in Chinese)
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). 北京: 人民卫生出版社, 2010.

[2] WHO/IUATLD. Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world; fourth global report. Geneva: WHO, 2008.

[3] WHO/IUATLD. Global Working Group on Antituberculosis Drug Resistance Surveillance. Guideline for surveillance of drug resistance in tuberculosis. Geneva: WHO/IUATLD, 1997.

[4] WHO. Global tuberculosis control report 2010. Geneva: WHO, 2010.

[5] WHO. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Geneva: WHO, 2008.

[6] WHO. WHO policy statement: molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis. Geneva: WHO, 2008.

[7] WHO. WHO policy statement: automated real-time nucleic acid

amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay. Geneva: WHO, 2011.

[8] Rosilawati ML, Yasmon A. Rapid detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum samples by radioisotope (32P)-based PCR dot blot hybridization and sequencing methods. Acta Med Indones. 2011, 43(1):34-38.

[9] Shenai S, Rodrigues C, Mehta A. Rapid speciation of 15 clinically relevant mycobacteria with simultaneous detection of resistance to rifampin, isoniazid, and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis* complex. Int J Infect Dis, 2009, 13(1):46-58.

[10] Ahmad S, Mokaddas E, Jaber AA. Rapid detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by PCR-RFLP targeting *embB* codons 306 and 497 and *iniA* codon 501 mutations. Mol Cell Probes, 2004, 18(5):299-306.

[11] Abbadi SH, Samea GA, Morlock G, et al. Molecular identification of mutations associated with anti-tuberculosis drug resistance among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Infect Dis, 2009, 13(6):673-678.

[12] Wang W, Li HM, Wu XQ, et al. Clinical application and evaluation of the detection of five drugs resistance genes in *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Tuberculosis Respiratory Dis, 2002, 25(11):670-673. (in Chinese)
王巍, 李洪敏, 吴雪琼, 等. 结核分枝杆菌五种耐药基因检测的临床应用及评价. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(11):670-673.

[13] Lee MF, Chen YH, Hsu HJ, et al. One-tube loop-mediated isothermal amplification combined with restriction endonuclease digestion and ELISA for colorimetric detection of resistance to isoniazid, ethambutol and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Microbiol Methods, 2010, 83(1):53-58.

[14] Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Feasibility of the GenoType MTBDRsl assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. J Clin Microbiol, 2009, 47(6):1767-1772.

[15] Kiet VS, Lan NT, An DD, et al. Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2010, 48(8):2934-2939.

[16] Mokrousov I, Otten T, Vyshnevskiy B, et al. Detection of *embB*306 mutations in ethambutol-susceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Northwestern Russia: implications for genotypic resistance testing. J Clin Microbiol, 2002, 40(10):3810-3813.

[17] Shi D, Li L, Zhao Y, et al. Characteristics of *embB* mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Henan, China. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(10):2240-2247.

[18] Tudó G, Rey E, Borrell S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(11):2341-2346.

[19] Johnson R, Streicher EM, Louw GE, et al. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Issues Mol Biol, 2006, 8(2):97-111.

[20] van Rie A, Warren R, Mshanga I, et al. Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. J Clin Microbiol, 2001, 39(2):636-641.

(收稿日期: 2011-10-09)
(本文编辑: 万玉立)