

PCR-探针熔解分析法检测结核分枝杆菌 氟喹诺酮耐药基因突变的 临床应用评价

李国利 李庆阁 王倩 陈澎 张灵霞

【摘要】 目的 评价 PCR-探针熔解分析法(PMAA)检测结核分枝杆菌(MTB)氟喹诺酮(FQ)药物耐药性的临床应用价值。方法 采用常规比例法和 PCR-PMAA 对 509 株 MTB 临床分离株进行 FQ 药物敏感性试验。对 69 株比例法和(或)PCR-PMAA 法检测耐药以及 440 株两法检测均敏感的 MTB 菌株中抽取的 55 株菌株进行 FQ 药物耐药相关基因 *gyrA* 和 *gyrB* PCR-DNA 测序。结果 以常规比例法为标准 PCR-PMAA 检测 FQ 药物耐药性的敏感性、特异性、阳性和阴性预测值、符合率及约登指数分别为 97.01%、99.55%、97.01%、99.55%、99.21% 及 0.97。比例法和(或)PCR-PMAA 检测耐药的 69 株中经 DNA 测序证实 44 株 *gyrA* 94 位密码子 GAC→AAC(D→N)或 CAC(H)或 GGC(G)或 GCC(A)突变;4 株 *gyrA* 91 位密码子 TCG→CCG(S→P)突变;19 株 *gyrA* 90 位密码子 GCG→GTG(A→V)或 AAG(K)突变;1 株 *gyrB* 500 位 GAC→AAC(D→N)突变;1 株在测序范围未见突变。55 株两法检测均敏感样品 DNA 测序结果证实 *gyrA* 和 *gyrB* 基因均未见耐药相关的基因位点突变。结论 PCR-PMAA 法能高效检出 MTB FQ 药物耐药相关基因突变,用于检测 MTB FQ 药物耐药性敏感性高、特异性强,方法简便、快速、价廉,具有良好的临床应用前景。

【关键词】 分枝杆菌;结核;探针熔解分析法;氟喹诺酮药物;耐药基因突变

Evaluation of clinical application of PCR-probe melting analysis assay for detection of fluoroquinolone-resistant mutations in mycobacterium tuberculosis clinical isolates LI Guo-li, LI Qing-ge, WANG Qian, CHENG Peng, ZHANG Ling-xia. Tuberculosis Research Institute, The 309th Hospital of PLA Beijing 100091, China

Corresponding author: LI Guo-li Email: guoli-li@sohu.com; LI Qing-ge Email: qgli@xmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical application of PCR-probe melting analysis assay (PMAA) for detection of fluoroquinolone (FQ)-resistant mutations in mycobacterium tuberculosis (MTB) clinical isolates. **Methods** The FQ (levofloxacin, LVF) drug susceptibilities of 509 MTB clinical isolates were determined by conventional proportion method (PM) and PMAA. The *gyrA* and *gyrB* gene sequencing of the 69 FQ-resistant clinical isolates detected by PM and/or PMAA and 55 FQ-sensitive clinical isolates detected by PM and PMAA were performed. **Results** Using PM as the control, the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, coincidence rate and Youden index of PMAA for testing FQ-resistant were 97.01%, 99.55%, 97.01%, 99.55%, 99.21% and 0.97 respectively. Among 69 FQ-resistant clinical isolates detected by PM and/or PMAA, 44 isolates showed the mutations in *gyrA* 94 GAC→AAC(D→N) or CAC(H) or GGC(G) or GCC(A), 4 isolates in *gyrA* 91 TCG→CCG(S→P), 19 isolated in *gyrA* 90 GCG→GTG(A→V) or AAG(K), 1 isolate in *gyrB* 500 GAC→AAC(D→N); 1 isolate showed no mutation in *gyrA* and *gyrB*. No mutation associated with resistance in *gyrA* and *gyrB* genes was detected in 55 FQ-sensitive MTB clinical isolates. **Conclusions** PCR-PMAA can effectively detect mutations

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.16.005

基金项目: 国家重大传染病防治科技重大专项资金(2008ZX10003-004)

作者单位: 100091 解放军第309医院结核病研究所(李国利、王倩、陈澎、张灵霞); 厦门大学生命科学院生物医学科学系分子诊断教育部工程研究中心(李庆阁)

通讯作者: 李国利, Email: guoli-li@sohu.com; 李庆阁, Email: qgli@xmu.edu.cn

in FQ-resistant gene of MTB, and also sensitive, specific, simple, rapid and inexpensive for FQ-resistant determination of MTB. It possesses a good prospect in clinical application.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; Probe melting analysis assay; Fluoroquinolone drug; Gene-resistant mutations

近年来,耐药结核病,特别是耐多药(multidrug-resistant, MDR)和广泛耐多药(extensively drug-resistant, XDR)结核病的出现和传播,使结核病成为严重危及全球的公共卫生问题之一。耐药结核病患者的及时发现对结核病的治疗及控制有着重大意义。氟喹诺酮(fluoroquinolone, FQ)药物是重要的二线抗结核药物,已应用于耐药和 MDR 结核病的治疗^[1]。随着该类药物应用的增加,临床上对该类药物的耐药率升高,我国结核病耐药基线调查报告(2007~2008 年)^[2]中报道 MDR 结核病患者中氧氟沙星(ofloxacin, OFX)耐药率高达 27.43%。

目前,临床实验室仍普遍采用以培养为基础、以细菌生长为终点判定结果的常规方法,即比例法或绝对浓度法检测结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis, MTB)对 FQ 药物的敏感性。试验操作复杂,且由于 MTB 生长缓慢,使其检测周期长,大约需 4~6 周方可获得结果。伴随着 MTB 耐药分子机制的阐明,通过检测耐药基因突变快速诊断耐药结核病的技术日益受到重视。在国外产品中,具有代表性的有德国 Hain 公司的 MTB 耐药基因突变检测试剂盒 GenoType MTBDRsl assay,它可以筛查 MTB 对乙胺丁醇、卡那霉素、卷曲霉素和 FQ 药物的耐药性^[3-5]。该试剂盒基于线性探针反向杂交法,操作步骤多,需 PCR 后的杂交过程,且试剂昂贵。国内目前尚无通过国家食品药品监督管理局批准的 MTB FQ 耐药基因突变检测商品化试剂盒上市。本文采用 PCR-探针熔解分析法(probe melting analysis assay, PMAA),通过检测 MTB 临床分离株 FQ 耐药相关基因突变,判断 MTB 对 FQ 药物的耐药性,建立了一种新型的 MTB FQ 药物敏感性检测方法,并同常规比例法药敏结果进行比较,以 DNA 测序结果证实,研究其临床应用价值。

材料与方法

1. 临床菌株:随机采用本室保存的 2006~2009 年收集的 509 株 MTB 临床分离菌株。经 7H10 琼脂培养基比例法药物敏感性试验检测 MTB 对 FQ 药物左氧氟沙星(levofloxacin, LVF)的药物敏感性, LVF 耐药界限定在 $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ 。

2. 仪器:美国伯乐公司生产的 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪。

3. DNA 模板制备:取适量改良罗氏培养基上生长的 MTB 培养物,悬浮于 250 μl DNA 提取液中, 99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 20 min, 12 000 g 离心 10 min, 取上清直接使用或移至 1.5 ml 离心管内, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 1 个月内使用, 避免反复冻融。

4. PCR 扩增:在 25 μl 反应体系中,含 19.6 μl FQ PCR MIX(内含 gyrA PCR 扩增引物、FAM 标记的 gyrA 耐药突变部位检测探针、4 \times dNTP、PCR 缓冲液和去离子水) 0.4 μl TB 酶混合液(内含 UNG 酶、taqDNA 聚合酶) 5 μl DNA 模板。同时设阴性和阳性对照(MTB H37Rv 株 DNA)。置 Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 扩增仪内, UNG 酶处理 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 90 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 预变性后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 20 s(每个循环下降 1 $^{\circ}\text{C}$) 和 78 $^{\circ}\text{C}$ 25 s touchdown 循环 10 次, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 和 78 $^{\circ}\text{C}$ 25 s 循环 40 次。95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 45~85 $^{\circ}\text{C}$ (设置在此阶段每 1 $^{\circ}\text{C}$ 采集 FAM 通道荧光信号) 循环 1 次。

5. PCR-PMAA 结果分析及解释:阳性对照,即野生型的熔点(T_m 值)范围为反应体系中 FAM 通道(71 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。通过比较所检测样品与阳性对照之间熔解曲线的 T_m 值的差异判断样品是否发生突变。样品熔点与阳性对照的熔点一致(误差不超过 1 $^{\circ}\text{C}$)时判定为野生型,试验菌株对 FQ 敏感;样品的熔点低于阳性对照 2 $^{\circ}\text{C}$ 及以上时($\Delta T_m \geq 2$ $^{\circ}\text{C}$)判定为突变型,试验菌株对 FQ 耐药。

6. DNA 测序:比例法和(或)PCR-PMAA 检测耐药的 69 株以及两法检测均敏感的 440 株 MTB 菌株中抽取的 55 株 MTB 临床分离株,参照文献^[6]报道方法对 FQ 耐药相关基因 gyrA 和 gyrB PCR 扩增后进行 DNA 测序。

结 果

1. 药物敏感性检测结果比较: PCR-PMAA 与比例法检测 509 株 MTB 临床分离株 FQ 药物敏感性结果比较见表 1。

表 1 PCR-PMAA 与比例法药敏结果比较(株)

PCR-PMAA 法	比例法		合计
	耐药	敏感	
耐药	65(A)	2(B)	67
敏感	2(C)	440(D)	442
合计	67	442	509

2. PCR-PMAA 与比例法比较各项指标计算及结果: 灵敏度(真阳性率) = $A/(A+C) \times 100\% = 65/67 \times 100\% = 97.01\%$; 特异性(真阴性率) = $D/(B+D) \times 100\% = 440/442 \times 100\% = 99.55\%$; 阳性预测值 = $A/(A+B) \times 100\% = 65/67 \times 100\% = 97.01\%$; 阴性预测值 = $D/(C+D) \times 100\% = 440/442 \times 100\% = 99.55\%$; 符合率 = $(A+D)/(A+B+C+D) \times 100\% = 505/509 \times 100\% = 99.21\%$; 约登指数 = $A/(A+C) + D/(B+D) - 1 = 0.97 + 1.00 - 1 = 0.97$ 。

3. DNA 测序结果: 比例法和(或) PCR-PMAA 检测 FQ 耐药的 69 株 MTB 菌株, 以及两法检测 FQ 均敏感的 55 株 MTB 菌株耐药相关基因 DNA 测序结果见表 2。所测所有菌株均显示 *gyrA* 95AGC→ACC(S→T) 突变, 表中未显示。该突变是 MTB 临床分离株存在的自然遗传多态性, 与 FQ 耐药无关^[6-8]。

表 2 耐药相关基因 *gyrA* 和 *gyrB* DNA 测序结果

比例法	PCR-PMAA	DNA 测序结果		菌株数
		<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	
耐药	耐药	GAC94AAC	WT	8
耐药	耐药	GAC94CAC	WT	1
耐药	耐药	GAC94GCC	WT	10
耐药	耐药	GAC94GGC	WT	23
耐药	耐药	TCG91CCG	WT	4
耐药	耐药	GCG90GTG	WT	18
耐药	耐药	GCG90AAG	WT	1
耐药	敏感	GAC94GCC	WT	1
耐药	敏感	WT	GAC500AAC	1
敏感	耐药	GAC94GCC	WT	1
敏感	耐药	WT	WT	1
敏感	敏感	WT	WT	55

注: WT: 野生型

讨 论

FQ 类药物作用于 MTB 的主要靶位点是 DNA 旋转酶, 通过抑制 DNA 旋转酶的活性, 使 DNA 复制停止, 导致细菌死亡。DNA 旋转酶由 A、B 两个亚基组成, 编码 A 亚基的 *gyrA* 基因突变是引起 FQ 药物耐药的主要机制, 突变主要发生在 FQ 耐药决定区内 88 位、89 位、90 位、91 位、94 位密码子^[9-13]。本文采用的 PCR-PMAA 以 *gyrA* 为靶基因序列对所测菌株样品进行 PCR 扩增, 扩增体系内同时含有 FAM 标记的 *gyrA* 基因 88~99 位核苷酸密码子的荧光探针。在 PCR 扩增中产生大量靶基因序列, 靶序列与探针杂交, 杂交产物具有

特定的熔点,含有突变的靶序列与探针的杂交产物熔点较低。通过实时监测靶序列熔点的变化,判断靶序列有无突变,以此判断菌株对 FQ 药物的耐药信息,实现对 FQ 药物敏感性的检测。

本研究从 440 株比例法与 PCR-PMAA 检测均敏感的 MTB 菌株中抽取 55 株样品进行 DNA 测序,结果证实所测 *gyrA* 和 *gyrB* 基因均未见与耐药相关的突变。69 株比例法和(或) PCR-PMAA 检测耐药菌株样品中,两法检测结果均耐药的 65 株样品,经 DNA 测序证实 44 株 *gyrA* 94 位密码子 GAC→AAC(D→N) 或 CAC(H) 或 GCC(A) 或 GGC(G) 突变; 4 株 *gyrA* 91 位密码子 TCG→CCG(S→P) 突变; 19 株 *gyrA* 90 位密码子 GCG→GTG(A→V) 或 AAG(K) 突变。1 株比例法检出耐药、PCR-PMAA 敏感, DNA 测序 *gyrA* 基因未见突变,在 *gyrB* 500 位密码子 GAC→AAC(D→N) 突变,该突变可能与 FQ 类药物耐药相关^[6,13],但由于 *gyrB* 突变较为罕见,PCR-PMAA 未含有 *gyrB* 突变检测探针,因而不能检出 *gyrB* 基因的突变。1 株比例法检出敏感、PCR-PMAA 耐药, DNA 测序证实 *gyrA* 94 位 GAC→GCC 突变,由于 *gyrA* 94 位 GAC→GCC 突变引起 FQ 低度耐药^[6],当菌株处于耐药临界水平时,比例法的实验偏差极易造成假阴性的结果。1 株比例法检出耐药、PCR-PMAA 敏感, DNA 测序 *gyrA* 94 位密码子 GAC→GCC 突变和 1 株比例法检出敏感、PCR-PMAA 耐药, DNA 测序未见突变,其原因可能是 PCR-PMAA 实验误差所致。

本研究结果表明,以常规比例法检测结果为判断标准,PCR-PMAA 检测 MTB 临床分离株 FQ 药物耐药性的敏感度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、符合率和约登指数分别为 97.01%、99.55%、97.01%、99.55%、99.21% 和 0.97。PCR-PMAA 检测 MTB FQ 药物耐药性不仅敏感性高、特异性强,与常规比例法符合率高,同时,与常规比例法和绝对浓度法以及以耐药基因检测为基础的 DNA 微阵列芯片法和线性探针膜杂交法相比,还具有以下优点:(1) 检测快速、通量高,对临床分离株培养物样品检测可在 3 h 内完成,且每次上机可同时检测 96 份样品。(2) 操作简便,PCR 与荧光探针杂交在同一反应体系内实时进行,不需 PCR 扩增后的杂交过程。(3) PCR 与荧光探针杂交在同一反应体系内闭管进行,不易造成实验室样品间 PCR 扩增子的交叉污染。(4) 检测结果阴性、阳性可通过熔解曲线 T_m 值进行判定,结果分析客观、易判定。(5) 方法可靠,检测基因突变部位的结果准确,对多份样品进行相应基因的 DNA 测序均证实与该方法的检测高度一致。

总之,新型的 PCR-PMAA 检测 MTB FQ 药物敏感性的方法,能简便、快速地高效检出 MTB FQ 药物耐药相关基因突变,实现对 MTB FQ 药物耐药性检测,不仅有助指导临床合理用药,同时有可能成为耐药结核病动态检测和流行病学研究的有力工具,具有良好的临床应用前景。

参 考 文 献

- [1] Kant S, Maurya AK, Kushwaha RA, et al. Multi-drug resistant tuberculosis: an iatrogenic problem. *Bio Science Trends* 2010; 4: 48-55.
- [2] 卫生部. 全国结核病耐药基线调查报告(2007-2008 年). 北京: 人民卫生出版社, 2010: 49-51.
- [3] 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: 1767-1772.
- [4] Brossier F, Veziris N, Aubry A, et al. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drug and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1683-1689.
- [5] 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: 2934-2939.
- [6] 李国利, 陈澎, 孙昌文, 等. 结核分枝杆菌对左氧氟沙星与莫西沙星的交耐药性及 *gyrA* 和 *gyrB* 基因突变分析. *中国防痨杂志* 2010; 32: 616-621.
- [7] Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* and detection of quinolone mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 773-780.
- [8] Guillemin I, Cambau E, Jarlier V, et al. Sequences of conserved region in the A subunit of DNA gyrase from nine species of the genus *Mycobacterium*: phylogenetic analysis and implication for intrinsic susceptibility to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2145-2149.
- [9] Giannoni F, Jona E, Sementilli F, et al. Evaluation of a new line probe assay for rapid identification of *gyrA* mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2928-2933.
- [10] Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2937-2939.

- [11] Feuerriegel S ,Cox HS ,Zarkua N ,et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ,53: 3353-3356.
- [12] Groll AV ,Martin A ,Jureen P ,et al. Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis and mutations ryrA and gyrB. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ,53: 4498-4500.
- [13] An DD ,Duyen NTH ,Lan NTN ,et al. Beijing genotype of Mycobacterium tuberculosis is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2009 ,53: 4835-4839.

(收稿日期: 2011-05-25)

(本文编辑: 戚红丹)

李国利,李庆阁,王倩,等. PCR-探针熔解分析法检测结核分枝杆菌氟喹诺酮耐药基因突变的临床应用评价[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版 2011, 5(16): 4641-4645.