

荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐利福平突变研究

马艳艳¹, 李辉², 赵东阳², 李静¹, 李庆阁³

1. 河南国际旅行卫生保健中心, 河南 郑州 450016; 2. 河南省疾病预防控制中心;

3. 厦门大学生命科学学院生物医学科学系

摘要: **目的** 对荧光 PCR 熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐利福平突变方法进行临床研究, 评价检测能力及在国境口岸的应用价值。 **方法** 应用荧光 PCR 熔解曲线法检测结核病人临床分离结核分枝杆菌, 以传统药物敏感性试验为标准, 获得该方法的灵敏性、特异性。 **结果** 对 347 例结核病人临床分离培养样本, 传统药物敏感性试验检出 271 例利福平敏感标本, 76 例利福平耐药标本。荧光 PCR 熔解曲线法检出 269 例利福平敏感标本, 78 例利福平耐药标本, 灵敏性为 93.42%, 特异性为 97.42%, 符合率为 96.54%。 **结论** 荧光 PCR 熔解曲线法检测速度快、灵敏度高、特异性强, 可用于结核分枝杆菌利福平耐药突变的快速检测, 适于国境口岸对耐多药结核病的快速筛查。

关键词: 结核分枝杆菌; 熔解曲线法; 利福平; 检测

中图分类号: R52 文献标识码: B

Evaluation of the mutations detection of *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by probe melting analysis based real-time PCR

MA Yan-yan, LI hui, ZHAO Dong-yang, LI Jing, LI Qing-ge

Henan International Travel Health Care Center, Zhengzhou, Heenan 450016, China

Abstract: **Objective** To evaluate the analysis abilities and valuation of the melting analysis based real-time PCR for detecting the mutations of *ropB* gene in *mycobacterium tuberculosis* from clinical samples at frontier port. **Methods** The probe melting analysis assay was adopted for the sensitivity and specificity in detecting the isolates from clinical samples against the standard of drug susceptibility testing (DST). **Results** A total of 347 *mycobacterium tuberculosis* isolates were detected by two methods, in which, 271 rifampin sensitivity isolates and 76 rifampin resistant isolates were gained by DST. Meanwhile, 269 rifampin sensitivity isolates and 78 rifampin resistant isolates were gained by the probe melting analysis assay, the sensitivity and specificity of melting analysis assay was 93.42% and 97.42%, respectively. The concordance of the two methods was 96.54%. **Conclusion** The probe melting analysis assay own the characteristics of short-time, higher sensitivity and specificity for detecting rifampin resistance in tuberculosis using clinical sample and is available to use for rapid screening multidrug drug resistant tuberculosis at frontier ports.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Melting analysis assay; Rifampin; Detect

结核病是一种重要的传染病, 据估计全球约有 1/3 的人感染, 约 10% 的感染者成为结核病人。随着抗结核药物的使用, 耐药结核病人逐渐增加, 其中耐多药结核病 (multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)^[1] 即至少同时对异烟肼和利福平 (RIF) 两种一线抗结核药物产生耐药的结核病人也逐年增加, 高治疗成本、长治疗周期、低治愈率是 MDR-TB 的特点^[2,3]。2009 年世界卫生组织报告统计, 全球目前有 49 万耐多药结核病患者, 占结核病总患病人数的 5%^[4], 而我国每年新发耐多药患者约 12 万人^[5]。国境口岸承担着出

入境人员中结核病监控任务, 要求对发现的结核病开展耐药的快速检测诊断, 这对口岸实验室检测能力提出了更高要求。快速检测耐药结核病已经成为了结核病控制工作的关键, 而随着对结核杆菌分子机理的认识和分子生物学技术的发展, 发展了多种耐多药结核病的分子检测方法。荧光 PCR 探针熔解曲线法, 以 *rpoB* 基因 81 bp 核心编码区作为靶序列, 依据该靶序列熔点变化获得利福平耐药信息, 实现对结核分枝杆菌利福平耐药性的检测。本研究对荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐利福平

突变方法进行临床研究,以评价其检测能力及在国境口岸筛查耐多药结核病的价值。

1 材料与方 法

1.1 材料 收集河南国际旅行卫生保健中心和河南省疾病预防控制中心筛查出痰涂片阳性肺结核病人的痰标本。

1.2 方 法

1.2.1 分离培养 对收集的阳性肺结核病人的痰标本进行分离培养,痰标本分离培养按照《结核病诊断实验室检验规程》进行。

1.2.2 比例法药物敏感性试验 对分离培养出的菌株进行结核分枝杆菌菌种鉴定并进行利福平药物敏感性试验,菌种鉴定使用对硝基苯甲酸(PNB)鉴别培养基和噻吩-2-羧酸肼(TCH)生长试验,利福平药物敏感性试验(40 μg/ml)为比例法,均按照《结核病诊断实验室检验规程》进行。

1.2.3 探针熔解曲线法检测 RIF 耐药 按照荧光 PCR 探针熔解曲线法结核分枝杆菌利福平耐药突变检测试剂盒(批号:10110401,厦门致善生物科技有限公司)说明书操作,固体培养基上生长的结核分枝杆菌,用标准接种环收集菌株 1 环,振荡悬在 250 μl TB DNA 提取液中,99℃加热 20 min,14 000 g 离心 10 min,吸取 5 μl 上清液,加入到含 20 μl PCR 反应液的反应管中,放入 CFX96 实时荧光 PCR 扩增仪(USA, Bio-Rad)进行扩增和熔解分析。PCR 反应程序:尿嘧啶糖苷酶(UNG)去污染处理 50℃ 2 min,1 个循环;预变性 95℃ 10 min,1 个循环;Touchdown 循环 95℃ 15 s,70℃ 20 s(每个循环下降 1℃),13 个循环;PCR 循环 76℃ 25 s,95℃ 15 s,57℃ 20 s,76℃ 25 s,42 个循环。熔解分析:95℃ 2 min,40℃ 2 min,45℃~85℃(设置在此阶段每 1℃采集 FAM 和 TET 通道荧光信号),1 个循环。当样本的熔解温度(T_m)与阳性对照的 T_m一致(误差不超过 1℃)时判定为野生型;样本的 T_m 低于阳性对照 2℃或 2℃以上时判定为突变型。

1.2.4 质量 控制

(1)进行比例法药物敏感性试验的实验室接受国家结核参比实验室的质量控制。

(2)荧光 PCR 探针熔解曲线试验按照试剂盒说明书进行质量控制。

(3)对探针熔解曲线法与比例法药物敏感性试验检测结果不一致的样本进行测序验证,用测序引物扩增包含 *rpoB* 待测区域的 350bp 的 DNA 片段,测序引物为:上游引物 5'-GGGAGCGGATGAC-CACCCA-3' 和下游引物 *rpoB*-R:5'-GCGGTACG-

GCGTTTCGATGAAC-3',测序由厦门大学分子诊断教育部工程研究中心进行。

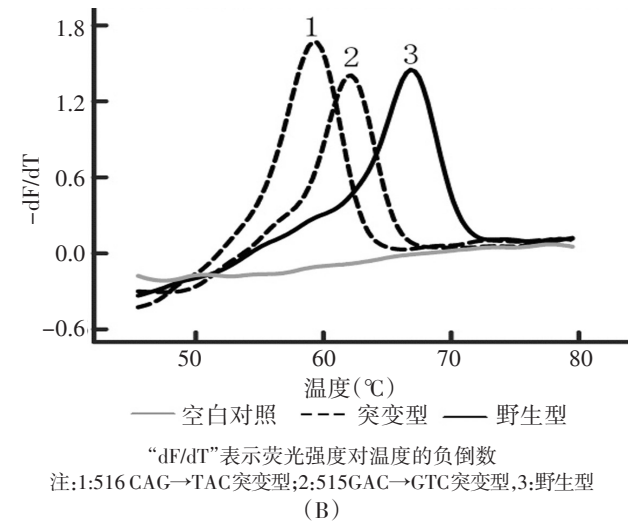
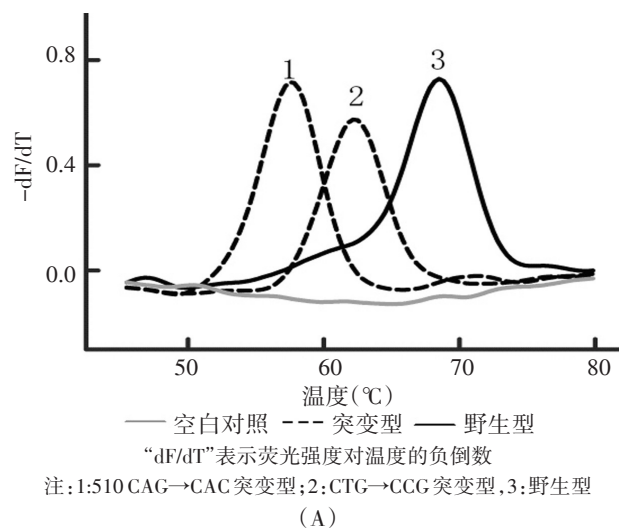
1.2.5 统计分析 使用 SPSS11.5 统计软件建立数据库并进行统计分析。

2 结 果

2.1 比例法药物敏感性试验 共收集涂片阳性的肺结核病人 350 例,经分离培养,剔除污染和未生长菌株 3 株,共获得 347 株菌株,经鉴定均为结核分枝杆菌,其中 271 例为利福平敏感菌株,76 例为利福平耐药菌株。

2.2 探针熔解曲线法检测 获得的 347 株临床分离结核分枝杆菌经探针熔解曲线法检测,其中 78 株为利福平耐药株,269 株为利福平敏感菌株。ABCD 4 个检测通道的典型熔解曲线结果如图 1 所示。

2.3 灵敏性和特异性 探针熔解曲线法同比例法药物敏感性试验比较,灵敏度为 93.42%(71/76),特异性为 97.42%(264/271),阳性预测值为 91.03%,阴性预测值为 98.14%(其中阳性为耐药,阴性为敏感),约登指数为 0.91,总符合率为 96.54%(表 1)。



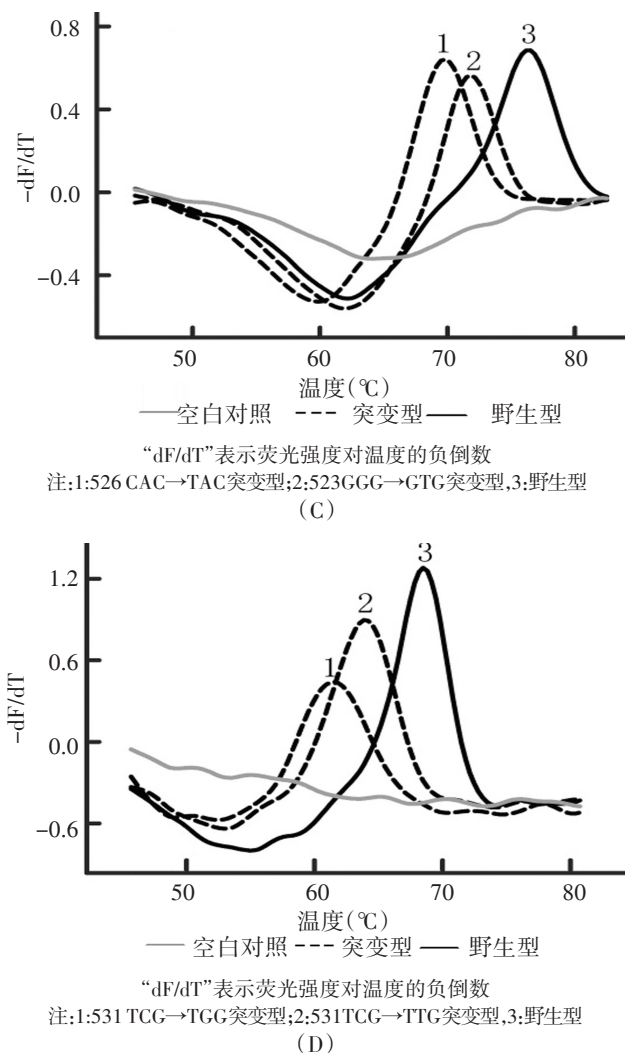


图 1 探针熔解曲线检测的典型结果

表 1 探针熔解曲线法与比例法药敏试验检测结核分枝杆菌耐药结果

	比例法药物敏感性试验		合计
	耐药	敏感	
探针熔解	71	7	78
曲线法	5	264	269
合计	76	271	347

2.4 测序验证 对 12 株探针熔解曲线法与药物敏感性试验结果不一致的结核分枝杆菌菌株进行了测序,5 株药物敏感性试验耐药而探针熔解曲线法检测敏感的菌株经测序,其中 4 株在 *rpoB* 核心区密码子从 507~534 (共 81bp) 未发生改变,为野生型菌株;1 株因测序失败未得到结果;7 株药物敏感性试验敏感而探针熔解曲线法检测耐药的菌株均发现了位点突变,2 株 531TCG→TTG,1 株 526CAC→AAC,1 株 526CAC→AGC,1 株 526CAC→GGC,1 株 533CTG→CTA,1 株 533CTG→CCG (表 2)。

表 2 探针熔解曲线法与药物敏感性试验检测结核分枝杆菌耐利福平不一致菌株测序结果

样本编号	标本	比例法药物敏感性试验	探针熔解曲线法	测序结果
9	结核分枝杆菌	耐药	敏感	野生
26	结核分枝杆菌	耐药	敏感	野生
30	结核分枝杆菌	耐药	敏感	野生
206	结核分枝杆菌	耐药	敏感	野生
283	结核分枝杆菌	耐药	敏感	—
67	结核分枝杆菌	敏感	耐药	526CAC→AAC
130	结核分枝杆菌	敏感	耐药	526CAC→AGC
154	结核分枝杆菌	敏感	耐药	533CTG→CTA
173	结核分枝杆菌	敏感	耐药	533CTG→CCG
255	结核分枝杆菌	敏感	耐药	531TCG→TTG
281	结核分枝杆菌	敏感	耐药	531TCG→TTG
332	结核分枝杆菌	敏感	耐药	526CAC→GGC

注:“—”测序失败未得结果。

3 讨论

结核病耐药的分子检测方法基于对结核分枝杆菌的基因位点突变实现,结核分枝杆菌对药物的耐受性主要是基因位点突变引起的,不同基因位点的突变联系了不同的药物耐受。*inhA*, *rpoB*, *rpsL*/*rrs*, *embB* 和 *gyrA* 基因位点突变联系着异烟肼 (INH), 利福平 (RIF), 链霉素 (SM), 乙胺丁醇 (EMB) 和喹诺酮 (Fluoroquinolone) 耐药^[6]。通过检测突变的基因位点,就能得到结核分枝杆菌的耐药谱,其中编码 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 基因其 81bp 核心区突变可以在 >95% 耐 RIF 结核分枝杆菌中检测到^[7], *rpoB* 基因突变是与 RIF 耐药高度相关的基因,结核分枝杆菌中检测出 *rpoB* 基因突变即能表明该菌株耐 RIF。同时,有研究表明耐 RIF 的菌株有 90% 的菌株同时耐 INH,使得 *rpoB* 基因突变成 MDR-TB 检测的标志位点^[8]。基于 *rpoB* 基因突变检测耐利福平的方法有 DNA 微阵列芯片技术晶芯[®] (中国,博奥)、线性探针膜杂交技术 GenoType MTBDRplus assay (德国, HAINS) 以及荧光 PCR 探针熔解曲线法。DNA 微阵列芯片和线性探针膜杂交技术可在 6~8 个 h 获得结果,但需要特殊仪器,操作步骤繁琐,对操作人员的技术要求高。而荧光 PCR 探针熔解曲线法在通用的荧光定量 PCR 仪上就能完成,不需要特殊的仪器设备,3 h 内既可以获得检测结果。

本研究使用的检测结核分枝杆菌耐利福平突变的荧光 PCR 探针熔解曲线法分为 2 个阶段,靶基因片段的扩增和扩增产物 DNA 的探针熔解分析。靶基

因片段的扩增阶段设计了分别标记不同荧光物质的4条探针,4条探针完全覆盖检测靶序列 *ropB* 基因核心区的所有81bp碱基,且相邻探针末端有2~3个碱基的重叠,从而保证了所有位置的突变均可得以检测^[9]。扩增产物DNA的探针熔解分析阶段利用探针与不同目标序列杂交能力的差异,探针与PCR扩增产物结合力的不同会导致T_m差异,即野生型基因具有特定熔点,基因发生突变能导致探针结合能力下降,熔点也会随之下降2℃~10℃不等,根据熔解曲线的T_m变化就可判断突变的有无,实现对利福平耐药核心区野生型与突变型的特异区分和检测。

研究中药物敏感性试验共检测出的76例利福平耐药标本,探针熔解曲线法检出了71例,灵敏度为93.42%;未能检测出的5份耐药标本,其中4例经测序验证,这4例标本在利福平耐药81bp核心区未发现突变,这与探针熔解曲线法的检测结果相一致。4份标本显示的表型耐药可能因为是81bp核心区外DNA序列发生突变引起的耐药或由于其他机制导致的耐药^[10]。

研究中271例药物敏感性结果为利福平敏感的标本中,探针熔解曲线法检出了263例敏感标本,另7例检测为利福平耐药,特异性为97.42%;对7例探针熔解曲线检测耐药的标本测序证实,2例发生了531TCG→TTG类型突变,1例526CAC→AAC类型突变,1例526CAC→AGC类型突变,1例526CAC→GCG类型突变,1例533CTG→CTA类型突变,1例533CTG→CCG类型突变,这些突变已有文献报道与利福平耐药相关^[11]。531TCG→TTG类型突变通常判定为高耐药菌株^[12],533CTG→CCG在以往的研究中分别有低水平利福平耐药^[13,14]和高水平利福平耐药的报道^[15];但因不同突变菌株个体在耐药水平上会存在差异及表型检测方法的不足,会存在基因检测发生了突变,但表型检测上可能显示不耐药或耐药水平很低。

探针熔解曲线法与药物敏感性试验的总符合率为96.54%,探针熔解曲线法和药物敏感性试验不符合的11株菌株经对81bp *ropB* 核心区测序,测序结果与熔解曲线法的结果一致,显示了探针熔解曲线法检测利福平耐药突变有很高的准确性。

探针熔解曲线法技术上采用了闭管法,检测样本和试剂一经混合于反应管中,直至获得结果,反应管不再打开,这使得检测过程中减少了扩增产物的污染。该方法也可以将PCR反应与探针熔解曲线分析分开完成,先在普通PCR仪器上扩增出产物,扩增产物再移至实时PCR仪器上进行探针熔解曲线分析,这样提高了操作的灵活性。

本研究表明,荧光PCR探针熔解曲线检测结核分枝杆菌耐药突变在检测利福平耐药上有很高的灵敏性和特异性,且检测快速、操作简便,可应用于结核分枝杆菌分离培养标本的耐利福平检测,适用于国境口岸对耐多药结核病的快速筛查。

参考文献

- [1] Alan R Hinman, James M Hughes, Dixie E Snider. Meeting the challenge of multidrug-resistant tuberculosis: summary of a conference. MMWR,1992,41(RR-11):51-57.
- [2] American Thoracic Society, CDC, Infectious Disease Society of America. Treatment of tuberculosis. MMWR,2003,52(RR-11):1-77.
- [3] Luna J.C.A tuberculosis guide for specialist physicians. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease[M].Paris:2004.
- [4] WHO.Global tuberculosis report control (surveillance, planning, financing). Geneva: WHO/HTM/TB,2008.
- [5] 中华人民共和国卫生部.全国结核病耐药基线调查报告(2007~2008年)[R].北京:人民卫生出版社,2010.
- [6] Stefan HE Kaufmann, Eric Rubin. Handbook of tuberculosis: Molecular biology and biochemistry. Germany[M]. WILEY-Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.
- [7] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al Detection of rifampicin resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis[J]. Lancet, 1993,341(8846):664-665.
- [8] Espinal MA, Dye C, Raviglione M. Rational 'DOTS plus' for the control of MDR-*rib*[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 1999,3(7):561-563.
- [9] 牛建军,张轶,温慧欣,等.应用探针熔解分析法检测结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变[J].中华预防医学杂志,2011,45(3):225-229.
- [10] Quan S, Venter H, Dabbs ER. Ribosylative inactivation of rifampin by Mycobacterium smegmatis is a principal contributor to its low susceptibility to this antibiotic[J]. Antimicrob Agents Chemother,1997,41(10):2456-2460.
- [11] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis:1998 update [J]. Tubercle and Lung disease,1998,79(1):3-29.
- [12] 谭守勇,谭耀驹,黎燕琼.对利福平耐药的结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变与耐药程度关系的探讨[J].中国实用内科杂志,2004,24(1):27-29.
- [13] Kiepiela P, Bishop K, Kormuth E. Comparison of PCR-heteroduplex characterization by automated DNA sequencing and line probe assay for the detection of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from KwaZulu-Natal, South Africa [J]. Microb Drug Resist, 1998, 4(4):263-269.
- [14] Ohno H, Koga H, Kuroita T. Rapid prediction of rifampin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155:2057-63.
- [15] Moghazeh SL, Pan X, Arain T. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates with known *rpoB* mutation[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(11):2655-2657.

收稿日期:2011-08-12