

PCR-探针熔解分析法检测结核分枝杆菌利福平耐药性的临床应用

李国利¹ 李庆阁^{2*} 王倩¹ 张灵霞¹

【摘要】 目的 评价 PCR-探针熔解分析法 (probe melting analysis assay, PMAA) 检测结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 对利福平 (rifampin, RFP) 耐药性的临床应用价值。方法 采用常规比例法和 PCR-PMAA 对 512 株 MTB 临床分离株进行 RFP 药敏试验, 并进行 RFP 耐药相关基因 rpoB DNA 测序。结果 以常规比例法为标准, PCR-PMAA 检测 RFP 耐药性的敏感性、特异性分别为 97.5%、96.2%, 阳性和阴性预测值分别为 94.1%、98.4%、符合率及约登指数分别为 96.7% 及 0.93。193 株比例法和 PCR-PMAA 两法检测均耐药的菌株, 经 DNA 测序证实 174 株 rpoB 基因 RFP 耐药决定区 (RFP resistance determining region, RRDR) 发生单位点密码子突变, 19 株 RRDR 发生不同组合型的双位点密码子联合突变; 5 株比例法检出耐药、PCR-PMAA 敏感的菌株, DNA 测序 rpoB 基因未见突变; 12 株比例法检出敏感、PCR-PMAA 耐药的菌株, DNA 测序证实其中 7 株 511 位点密码子突变, 5 株 533 位点密码子突变; 302 株两法检测均敏感菌株 DNA 测序结果未见 rpoB 耐药相关的基因位点突变。PCR-PMAA 检测 MTB 临床分离株 rpoB 基因突变结果与 DNA 测序结果完全一致。结论 PCR-PMAA 法能高效检出 MTB 对 RFP 耐药的相关基因突变, 用于检测 MTB 对 RFP 耐药性的敏感性高、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】 结核分枝杆菌 探针熔解分析法 利福平 耐药基因 突变

Evaluation of PCR-probe melting analysis assay for detection of rifampin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

LI Guo-li, LI Qing-ge, WANG Qian, et al

(Tuberculosis Research Institute, the 309th Hospital of PLA, Beijing 100091)

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical application of PCR-probe melting analysis assay (PMAA) for detection of rifampin (RFP)-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) clinical isolates. **Methods** Conventional proportion method (PM) and PCR-PMAA were used to do RFP drug susceptibility test of 512 MTB clinical isolates. The rpoB genes of all clinical isolates were sequenced. **Results** Using PM as control, the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, coincidence rate and Youden index with PCR-PMAA of RFP-resistance test were 97.5%, 96.2%, 94.1%, 98.4%, 96.7% and 0.93 respectively. In 193 RFP-resistant clinical isolates detected by both PM and PCR-PMAA methods showed that, 174 had single codon mutations and 19 had double codon mutations in RFP resistance determining region of rpoB gene; 5 clinical isolates were RFP-resistant by PM method but RFP-sensitive by PCR-PMAA method had no mutations in rpoB genes; Among 12 clinical isolates of RFP-sensitive by PM method and RFP-resistant by PCR-PMAA method, 7 mutations were at 511 codon and 5 mutations were at 533 codon in rpoB gene. No mutations associated with resistance in rpoB gene were found in 302 RFP-sensitive clinical isolates by both PM and PCR-PMAA methods. The mutations in rpoB genes of MTB clinical isolates tested by PCR-PMAA method were identical with DNA sequencing. **Conclusions** PCR-PMAA method could effectively detect mutations in RFP-resistant genes of MTB, and it is sensitive, specific, simple, rapid and inexpensive for RFP-resistance determination of MTB. It possesses a

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

1. 北京, 解放军第三〇九医院结核病研究所 (邮编 100091)

2. 厦门大学生命科学院生物医学科学系

* 通讯作者

good prospects in clinical application.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis* Probe melting analysis assay Rifampin Drug-resistant Gene mutation

结核病至今仍是危及人类健康的重大传染病之一。耐药结核病,尤其是耐多药和广泛耐药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。及时发现耐药结核病患者对结核病的治疗及控制有着重大意义。利福平(rifampin, RFP)是抗结核联合化疗中主要的一线药物,在结核病化疗中起着重要作用。

目前,临床实验室常规采用的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)比例法或绝对浓度法药敏试验,操作复杂,检测周期长达4~6周。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。本研究采用PCR-探针熔解分析法(probe melting analysis assay, PMAA),通过检测MTB临床分离株 rpoB 基因中 RFP 耐药决定区(RFP resistance determining region, RRDR)81个碱基范围的突变,判断MTB对RFP的耐药性,并同常规比例法药敏结果进行比较,报告如下。

材料与方法

一、材料

1. 菌株:采用本室保存的MTB标准株H37Rv和2006-2010年收集的512株MTB临床分离菌株。

2. 药物:RFP 25 g/瓶,批号:074K1601, Sigma 公司产品。

3. 培养基:改良罗氏培养基和RFP含药改良罗氏培养基由本室自制。用于比例法药敏检测的RFP含药培养基药物终浓度为40 μg/ml,用于最小抑菌浓度(MIC)检测的RFP含药培养基药物终浓度分别为0.5、1.0、5、10、20、30、40、50、60、80 μg/ml。

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

二、方法

1. 药敏试验:参照《结核病诊断实验室检验规程》^[1]进行MTB临床分离株的RFP比例法药敏试验。

2. 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,于

99℃加热20 min, 12 000 r/min离心10 min,取上清直接使用或移至1.5 ml离心管内,-20℃保存,1个月内使用,避免反复冻融。

3. PCR-PMAA检测:PCR-PMAA在A和B双管内进行,A和B管各25 μl反应体系中分别含19.6 μl RFP PCR混合液A和B,二者内均含 rpoB PCR扩增引物、4×dNTP、PCR缓冲液和去离子水,分别含有羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM)、四氯荧光素(tetrachlorofluorescein, TET)标记的 rpoB 511、526密码子区双探针和516、531密码子区双探针,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℃2 min,90℃10 min预变性后,95℃15 s、70℃20 s(每个循环下降1℃)和76℃25 s touchdown循环13次,95℃15 s、57℃20 s和78℃25 s循环42次,95℃2 min,40℃2 min,40~85℃(设置在此阶段每1℃采集FAM和TET通道荧光信号),循环1次。

4. PCR-PMAA结果分析及解释:阳性对照,即野生型在各反应体系及各通道中的熔解曲线的熔点(T_m)值范围如下:反应体系A中FAM通道(66±1)℃,TET通道(74±1)℃;反应体系B中FAM通道(65±1)℃,TET通道(67±1)℃。通过比较所检测样品与阳性对照之间T_m值的差异,判断样品是否发生突变。当4个通道中样品熔点与阳性对照的熔点均一致(误差不超过1℃)时判定为野生型,试验菌株对RFP敏感;4个通道任一通道中样品的熔点低于阳性对照2℃及以上时(ΔT_m≥2℃)判定为突变型,试验菌株对RFP耐药。

5. DNA测序:参照文献[2]的方法对RFP耐药相关基因 rpoB PCR扩增后进行DNA测序。

6. MIC检测:刮取适量在改良罗氏培养基上传代培养3周龄生长良好的MTB H37Rv株和MTB临床分离株培养物,在带玻璃珠无菌0.5%吐温80-生理盐水试管内磨菌制备菌悬液,振荡2~3 min后,室温静置15~20 min,取上层液体稀释制备1 mg/ml (MacFarland No.1)菌悬液。将1 mg/ml菌悬液10倍比稀释至10⁻² mg/ml,分别接种于含药培养基和不含

药对照培养基斜面上,接种菌终浓度为 10^{-3} mg/ml。置 37 °C 培养 4 周后观察结果。不含药对照管生长旺盛,以不含肉眼可见菌落或菌落数少于 1% 的药物浓度最低管为 MIC。

结 果

一、PCR-PMAA 与比例法药敏结果比较

PCR-PMAA 与比例法检测 512 株 MTB 临床分离株 RFP 药敏结果比较见表 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	193	12	205
敏感	5	302	307
合计	198	314	512

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 RFP 药物耐药性的敏感性、特异性分别为 97.5%、96.2%,阳性预测值、阴性预测值分别为 94.1%、98.4%,符合率和约登指数分别为 96.7% 和 0.93。

二、PCR-PMAA 与 DNA 测序结果比较

PCR-PMAA 检测为 RFP 耐药的 205 株 MTB 临床分离株,DNA 测序均显示 rpoB 基因不同位点密码子突变;PCR-PMAA 检测为 RFP 敏感的 307 株 MTB 临床分离株,DNA 测序均未见 rpoB 基因突变,PCR-PMAA 检测 MTB 临床分离株 rpoB 基因突变结果与 DNA 测序结果完全一致,见表 2。

三、MIC 测定结果

MTB 标准株 H37Rv 株的 RFP MIC 为 1 μ g/ml。比例法敏感的 7 株 511 位密码子突变株 RFP MIC 检测,2 株 MIC 为 5 μ g/ml,4 株为 10 μ g/ml,1 株为 20 μ g/ml;比例法敏感的 5 株 533 位密码子突变株 RFP MIC 检测,其中 1 株 MIC 为 10 μ g/ml,3 株为 20 μ g/ml,1 株为 30 μ g/ml;比例法耐药的 6 株 533 位密码子突变株 RFP MIC 检测结果表明,其中 4 株 MIC 为 40 μ g/ml,2 株为 60 μ g/ml。

讨 论

RFP 是一种广谱抗菌药物,对 MTB 亦具有良好抗菌活性,RFP 通过与 MTB RNA 聚合酶 B 亚基结合,抑制转录起始,实现杀菌效果。rpoB 是细菌 DNA

表 2 PCR-PMAA 与 DNA 测序结果比较

PCR-PMAA	rpoB 基因测序密码子突变位点	菌株数
R	512 位	1
R	513 位	2
R	516 位	14
R	522 位	1
R	526 位	44
R	531 位	106
R	533 位	6
R	505 位+511 位	1
R	508 位+526 位	1
R	509 位+531 位	1
R	510 位+526 位	1
R	511 位+516 位	2
R	511 位+526 位	3
R	515 位+516 位	1
R	515 位+533 位	1
R	516 位+522 位	2
R	516 位+526 位	1
R	516 位+531 位	1
R	516 位+533 位	1
R	524 位+531 位	1
R	526 位+529 位	1
R	526 位+533 位	1
R	511 位	7
R	533 位	5
S	WT	307

注:R 为耐药;S 为敏感;WT 为野生型

依赖的 RNA 聚合酶 B 亚单位的编码基因,现有的研究表明 rpoB 基因中长 81 个碱基的核心区域(编码 507~533 位共 27 个氨基酸的密码子),即 RRDR 发生突变时,使 RNA 聚合酶 B 亚单位酶结构改变,RFP 不能与细菌 RNA 聚合酶 B 亚单位结合,而出现耐药^[3]。已证明 RFP 耐药的 MTB 临床分离株中 90% 以上,甚至 > 97% 可发生 rpoB 基因 RRDR 突变^[4-10],至今已发现 80 余种单位点密码子突变、70 余种双或 3 位点密码子联合突变、20 余种缺失突变和 4 种插入突变类型^[4,5,9,11-18]。本研究采用的 PCR-PMAA 以 rpoB 为靶基因序列对所测菌株样品在 2 个 PCR 反应体系扩增,A 反应体系内含有 FAM 标记的 rpoB 511 密码子区和 TET 标记的 rpoB 526 密码子区探针,B 反应体系内含有 FAM 标记的 rpoB 516 密码子区和 TET 标记的 rpoB 531 密码子区探针,4 条探针涵盖了 rpoB 基因 507~533 位核苷酸密码子,能检测

该区域所有位点的突变。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。以荧光为检测信号,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 RFP 药物的耐药信息,实现对 RFP 药敏的检测。

本研究对 302 株比例法与 PCR-PMAA 检测均敏感的 MTB 菌株进行 DNA 测序,结果证实所测 rpoB 基因未见与耐药相关的突变。210 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 193 株样品,经 DNA 测序证实 174 株 RRDR 发生单位点密码子突变,19 株 RRDR 发生不同组合型的双位点密码子联合突变;5 株比例法检出耐药,PCR-PMAA 敏感,DNA 测序 rpoB 基因未见突变;12 株比例法检出敏感,PCR-PMAA 耐药的菌株,DNA 测序证实其中 7 株 511 位点密码子突变,5 株 533 位点密码子突变,尽管 PCR-PMAA 与比例法所得结果不一致,但其与 DNA 测序结果相一致。关于 533 位点密码子突变与 RFP 的耐药相关性,在不同研究中突变菌株显示表型耐药或敏感^[4,7,10,13,15];国内外研究表明 511 位点密码子突变常伴随其他位点的联合突变而引起耐药,其联合突变类型达 20 余种,在 RFP 耐药株中发现 511 位点密码子单位点突变的频率很低,仅为 0~1.67%^[4-6,10,13,15]。本研究在敏感株中发现 511 位点密码子单位点突变,这在目前的报道中少见。为进一步探讨 511 位和 533 位密码子突变与 MTB RFP 耐药的相关性,本研究对 rpoB 基因 511 位密码子单位点突变的 7 株 MTB 临床分离株(比例法敏感)和 rpoB 基因 533 位密码子单位点突变的 11 株 MTB 临床分离株(6 株比例法耐药、5 株比例法敏感)RFP 的 MIC 测定,结果表明 511 位点突变株的 MIC 为 5~20 $\mu\text{g/ml}$,533 位点突变株的 MIC 为 10~60 $\mu\text{g/ml}$ 。结果提示 MTB rpoB 511 位点突变可能与 RFP 低度耐药相关,533 位点突变则处于比例法 RFP 耐药判定的临界值或低于临界值的低度耐药。这一结果表明某些比例法或绝对浓度法敏感的菌株可能已出现 RFP 低度耐药,应用 PCR-PMAA 检测 rpoB 基因 511、533 位点突变则可以发现该类菌株,给临床治疗以提示。

本研究结果表明,PCR-PMAA 检测 MTB RFP 耐药性的敏感性高、特异性强、与常规比例法符合率高。同时,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 48 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;③PCR 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,检测基因突变类型广泛,能检测 rpoB RRDR 内的各种类型突变;检测基因突变部位结果准确,该方法与 DNA 测序结果一致;⑥价格相对低廉。

总之,新型的 PCR-PMAA 检测 MTB RFP 药敏的方法,能简便、快速、准确、高效地检出 MTB RFP 耐药相关基因突变,实现对 MTB RFP 耐药性的检测,不仅有助于指导临床合理用药,同时有可能成为耐药结核病动态监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] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京:中国教育文化出版社,2006:49-51.
- [2] 李国利,张灵霞,王倩,等. 结核分枝杆菌临床分离株利福平耐药表型及 rpoB 基因分析. 临床和实验医学杂志,2001,10:1649-1652.
- [3] Science Direct. Rifampin. Tuberculosis,2008,88:151-154.
- [4] Huang H, Jin Q, Ma Y, et al. Characterization of rpoB mutations in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolated in China. Tuberculosis,2002,82:79-83.
- [5] Herrera L, Jiménez S, Valverde A, et al. Molecular analysis of rifampicin Mycobacterium tuberculosis isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the rpoB gene and review of the literature. Int J Antimicrob Agents,2003,21:403-408.
- [6] Jiao W, Igor M, Sun G, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Beijing, China. Chin Med J,2007,120:814-819.
- [7] Bravo LTC, Tuohy MJ, Ang C, et al. Pyrosequencing for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis resistance to rifampin, isoniazid, and fluoroquinolones. J Clin Microbiol,2009,47:3985-3990.
- [8] Campbell PJ, Morlock GP, Sikes D, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemothe,2011,55:2032-2041.
- [9] Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, et al. Molecular Characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Kazakhstan. Jap J Infect Dis,2011,64:253-255.
- [10] 王海英,许勇,邓云峰,等. 山东省耐利福平结核分枝杆菌 rpoB

- 基因突变的研究. 中国防痨杂志,2005,27:289-292.
- [11] Tracevska T, Jansone I, Broka L, et al. Mutations in the rpoB and KatG Genes leading to drug resistance in Mycobacterium tuberculosis in Latvia. J Clin Microbiol,2002,40:3789-3792.
- [12] Ahmad S, Mokaddas E, Fares E, et al. Characterization of rpoB mutations in rifampin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates from Kuwait and Dubai. Diagn Micr Infec Dis,2002,44:245-252.
- [13] Caws M, Duy PM, Tho DQ, et al. Mutation prevalent among rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from a hospital in Vietnam. J Clin Microbiol,2006,44:2333-2337.
- [14] Huitric E, Werngren J, Juréen P, et al. Resistance levels and rpoB gene mutations among in vitro-selected rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis mutants. Antimicrob Agents Chemother,2006,50:2860-2862.
- [15] Miotto P, Piana F, Penati V, et al. Use of genotype MTBDR assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical strains isolated in Italy. J Clin Microbiol,2006,44:2485-2491.
- [16] Aslan G, Tezcan S, Serin MS, et al. Genotypic analysis of isoniazid and rifampin resistance in drug-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates in Southern Turkey. Jap J Infec Dis,2008,61:255-260.
- [17] Zaczek A, Brzostek A, Augustynowicz-Kopec E, et al. Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampin. BMC Microbiol,2009,9:10.
- [18] Hauck Y, Fabre M, Vergnaud G, et al. Comparison of two commercial assay for the characterization of rpoB mutation in Mycobacterium tuberculosis and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. J Antimicrob Chemother,2009,64:259-262.

(收稿:2012-03-15)

• 临床经验交流 •

肺结核合并下呼吸道真菌感染病原菌的分布及药敏分析

陈建飞¹ 钟志宏²

对我院 2011 年 7~12 月 207 例肺结核合并下呼吸道真菌感染患者病原菌的分布及对常用抗真菌药物的耐药现状进行回顾性分析,报告如下。

材料与方 法

1. 标本来源:收集肺结核患者的痰液、咽拭子、纤支镜痰液、肺泡灌洗液标本。

2. 方法:送检标本进行真菌培养。按操作规程^[1],取标本直接接种在沙氏琼脂及显色琼脂,35℃培养、分离并进行菌种鉴定和药敏试验。参照 2011 版美国临床实验室标准化委员会标准(NCCLS)进行结果判断。

3. 统计学方法:应用 WHONET 5.4 软件。

结 果

1. 真菌分类:207 株真菌中,白色念珠菌 126 株(60.9%),热带念珠菌 29 株(14.0%),光滑念珠菌 17 株(8.2%),近平滑念珠菌 14 株(6.8%),克柔念珠菌 12 株(5.8%),曲霉菌 3 株(1.4%),其他念珠菌 6 株(2.9%)。

2. 药敏结果:207 株真菌的药敏结果见表 1。敏

感率由高到低依次为两性霉素 B、5-氟胞嘧啶、氟康唑、伊曲康唑、益康唑和酮康唑。

表 1 药敏试验结果[株(%)]

药物	敏感	中敏	耐药
两性霉素 B	207(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
5-氟胞嘧啶	201(97.1)	2(1.0)	4(1.9)
氟康唑	194(93.7)	1(0.5)	12(5.8)
伊曲康唑	189(91.3)	2(1.0)	16(7.7)
益康唑	152(73.4)	6(2.9)	49(23.7)
酮康唑	146(70.5)	6(2.9)	55(26.6)

讨 论

肺结核患者多伴有支气管黏膜上皮受损,气道反应性增高,渗出、增生、干酪及空洞等病变,不同程度损害了肺组织结构的完整性,给真菌的定植、生长提供了有利环境。肺结核患者由于营养不良、低蛋白血症等原因,机体免疫功能下降,易合并真菌感染^[2]。

(下转第 795 页)

1.浙江金华广福医院检验科(邮编 321000)

2.长沙,湖南师范大学医学院微生物教研室