

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.24.005

文章编号: 1005-8982(2016)24-0024-04

临床论著

## 结核分枝杆菌临床分离株利福平和异烟肼 耐药性检测方法比较\*

李同霞<sup>1</sup>, 江国峰<sup>2</sup>, 郝文嘉<sup>1</sup>, 曹佳伟<sup>2</sup>, 苏海涛<sup>1</sup>, 肖谦<sup>3</sup>, 王丙瑞<sup>4</sup>

(山东省青岛市胸科医院 1. 结核科, 2. 检验科, 山东 青岛 266043; 3. 山东省青岛市第九人民医院 内科, 山东 青岛 266000; 4. 山东省无棣县余集镇卫生院, 山东 无棣 251900)

**摘要:目的** 探讨基因芯片法和改良罗氏培养及比例法药敏试验在结核分枝杆菌(MTB)利福平(RFP)和异烟肼(INH)耐药性测定中的应用价值。**方法** 应用基因芯片法检测 200 株 MTB 临床分离株 RFP 耐药基因 rpoB 的 6 个位点、13 种突变型, INH 耐药基因 katG 的 1 个位点、2 个突变型和 INH inhA 基因启动子 -15 位、1 个 C→T 突变型。同时对 MTB 菌株进行罗氏培养及比例法药敏试验, 并比较测定结果的敏感性、特异性和符合率。**结果** 基因芯片法检测敏感株 152 株、耐药株 48 株, 罗氏比例法检测敏感株 161 株、耐药株 39 株。若以罗氏比例法测定结果为判断标准, 基因芯片法检测 RFP 耐药性的敏感性、特异性和符合率分别为 85.0%、98.8% 和 97.5%; 检测 INH 耐药性的敏感性、特异性、符合率分别为 82.8%、92.4% 和 91.0%。**结论** 基因芯片法对结核菌耐药菌株可做出初筛, 与结核菌药敏试验联合检测可提高诊断率。

**关键词:** 分枝杆菌, 结核; 药物敏感性; 基因芯片; 比例法; 异烟肼; 利福平

**中图分类号:** R446.5; R52

**文献标识码:** A

## Comparison of two methods detect of Mycobacterium tuberculosis clinical isolates resistance to rifampin and isoniazid\*

Tong-xia Li<sup>1</sup>, Guo-feng Jiang<sup>2</sup>, Wen-jia Hao<sup>1</sup>, Jia-wei Cao<sup>2</sup>, Hai-tao Su<sup>1</sup>,  
Qian Xiao<sup>3</sup>, Bing-rui Wang<sup>4</sup>

(1. Department of tuberculosis medicine, 2. Department of Laboratory, Qingdao Chest Hospital, Qingdao, Shandong 266043, China; 3. Qingdao Ninth People's Hospital, Qingdao, Shandong 266000, China; 4. Clinical Laboratory, Shandong Wudi County Shejia Central Hospital, Wudi, Shandong 251900, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the use of gene chip, Lowenstein-Jensen (L-J) culture method and proportion method in detecting Mycobacterium tuberculosis (MTB) resistant of rifampin (RFP) and isoniazid (INH). **Methods** A total of 200 MTB clinical isolates were chosen, 6 sites of resistant gene rpoB and 13 kinds of mutant of RFP were detected, and 1 site of resistant gene katG, 2 kinds of mutant and inhA gene promoter-15, 1 kind of C→T mutant of INH were detected. Meanwhile drug susceptibility of the 200 MTB clinical isolates with rapid culture and proportion method were detected. Then the sensitivity, specificity and accuracy were compared. **Results** A number of 152 sensitive isolates and 48 resistant isolates were detected by gene chip, and 161 sensitive isolates and 39 resistant were isolated by proportion method. If the result of proportion method was set as criteria, the sensitivity, specificity and accuracy of gene chip test RFP drug were 85%, 98.9% and 97.5%, for INH they were 82.8%, 92.4%, 91%. **Conclusions** Gene chip method can be used to preliminarily screen the drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. Joint detection with proportion method can improve the diagnostic rate.

**Keywords:** mycobacterium tuberculosis; drug susceptibility; gene chip; proportion method; isoniazid; rifampin

收稿日期: 2016-02-19

\* 基金项目: 青岛市科技局公共领域科技支撑计划课题(No: 13-1-3-65-nsh)

[通信作者] 江国峰, E-mail: [gdxyy@126.com](mailto:gdxyy@126.com); Tel: 15653267267

据世界卫生组织估算,目前全球已有 20 亿人感染结核分枝杆菌,每年新发结核患者达 1 000 万例,约有 180 万人因结核病死亡。近年来,耐药结核病疫情日趋严重,已成为结核病控制困难、死亡率增高的重要原因。利福平(Rifampicin,RFP)和异烟肼(Isoniazid,INH)是治疗结核病的最有效药物,但是近年来 RFP 和 INH 的耐药率显著上升,全国第 5 次结核病流行病学抽样调查,我国耐多药肺结核现状不容乐观,初始耐多药率最高地区 10.4%,最低 2.1%,获得性耐多药率最高地区 36.8%,最低 7.9%,总耐多药率最高 16.1%,最低 3.5%<sup>[1]</sup>。因此,快速、准确地测定结核分枝杆菌(MTB)对 RFP 和 INH 的耐药性已成为有效控制结核病的关键。目前,改良罗氏培养加药敏仍是基层医院检测结核菌耐药的主要手段,较 Bactec-960 价廉,但是需时长;基因芯片技术日臻成熟,检测结核分枝杆菌对 RFP、INH 的耐药性,耗时少,可大大缩短耐多药肺结核的诊断时间。本研究通过比较 2 种检测方法,分析其在耐多药肺结核诊治中的价值。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 菌株来源** 随机选取 2013 年 1 月-2014 年 12 月青岛市胸科医院结核科门诊和住院患者 200 例。取患者痰液、肺泡灌洗液等为标本,按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分枝杆菌分离培养,菌种鉴定,保存于菌株库。所有患者诊断均依据 2006 年版《临床诊疗指南结核病分册》的诊断标准确诊<sup>[2]</sup>,经痰或肺泡灌洗液结核分枝杆菌培养阳性的结核病者。结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 来自中国疾病预防控制中心。

**1.1.2 改良罗氏固体培养基和罗氏比例法** 药敏培养基均购自珠海贝索生物技术有限公司。

**1.1.3 芯片的制作及检测设备** 结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒、晶芯 Biomixer 芯片杂交仪、晶芯 Slide Washer™ 芯片洗干仪、晶芯 Lux Scan 10K-B 微阵列芯片扫描仪和 Extractor 36 核酸快速提取仪均由博奥生物有限公司生产。Bio-rad CFX96 PCR 荧光扩增仪由美国伯乐公司生产。

### 1.2 实验方法

取出保存于本院菌株库中 200 株 MTB 临床分离株,将待检菌株转种至罗氏培养基,37℃培养 2 周进行复苏,以 H37Rv 为标准菌株。

采用罗氏比例法药敏试验,刮取多处复苏菌落,旋紧瓶盖,在涡旋振荡器上混旋 0.5~1.0 min,加入灭菌的 PBS 缓冲液,直至其浊度与标准麦氏管(Mac Farland NO.1)一致,即得到 1 mg/ml 的菌液。菌悬液静置片刻,使其中的颗粒或菌块沉淀,用 22 SWG 标准接种环或微量吸管无菌操作逐步稀释至 10<sup>-2</sup> mg/ml 和 10<sup>-4</sup> mg/ml。

用 22 SWG 标准接种环分别沾取 1 环(即 0.01 ml) 10<sup>-2</sup> mg/ml 和 10<sup>-4</sup> mg/ml 的菌液,用划线法均匀接种于含药培养基和对照培养基斜面,应注意使菌液尽可能均匀分散于培养基斜面。最终接种菌量为 10<sup>-4</sup> mg 和 10<sup>-6</sup> mg。

接种后的培养基置 37℃培养,4 周后观察结果。RFP 耐药界定浓度为 40 μg/L,INH 耐药界定浓度为 0.2 μg/L。

### 1.3 基因芯片药敏(DNA 微阵芯片法)

用无菌接种环挑取一个肉眼可见复苏菌落,置于含有核酸提取液的核酸提取管中。使用 Extractor 36 核酸快速提取仪振荡 5 min,95℃水浴 5 min,5 000 r/min 离心 1 min。

配置 PCR 反应体系至于 Bio-rad CFX96 PCR 荧光扩增仪,按下列热循环程序扩增。见附表。

附表 PCR 热循环程序

温度 /℃	时间 /s	循环数 / 个
37	600	1
94	600	1
94	30	35
60	30	35
72	40	35
94	30	10
72	60	10
72	420	1
4	-	1

取杂交缓冲液 9 μl,PCR 产物各 3 μl 混匀,95℃热浴 5 min,使 PCR 产物变性,随后立即置于冰水混合物中骤冷 3 min。取 13.5 μl 杂交溶液经加样孔加入芯片点阵,置杂交仪,50℃杂交 2 h 后置洗干仪中进行洗涤甩干。

将完成洗涤、甩干的芯片插入扫描仪插槽内,进行芯片扫描和结果判读,完成判读的芯片需室温避光保存,并详细记录判读结果和芯片信息。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,以罗氏

比例法药敏结果作为金标准<sup>[3]</sup>,计算基因芯片法检测 RFP 和 INH 耐药性的敏感性及特异性,并比较 2 种方法的符合率。应用  $\chi^2$  检验比较 2 种方法的差异性, $P>0.05$  为差异无统计学意义。应用 Kappa 检验对 2 种检测方法进行一致性分析, $0.75 \leq \text{Kappa} \leq 1$  提示高度一致, $0.4 \leq \text{Kappa} < 0.75$  提示中度一致, $\text{Kappa} < 0.4$  提示低度一致。

## 2 结果

### 2.1 罗氏比例法药敏试验结果

以罗氏比例法药敏试验的结果为金标准,基因芯片法检测 RFP 耐药的敏感性为 85.0%(17/20),特异性为 98.9%(178/180),符合率为 97.5%(195/200)。基因芯片法检测 INH 耐药的敏感性为 82.8%(24/29),特异性为 92.4%(158/171),符合率为 91.0%(182/200)。总符合率为 94.3%(377/400)。经  $\chi^2$  检验, $P_{\text{RFP}}=0.866$ , $P_{\text{INH}}=0.281$ ,提示这 2 种方法检验 RFP 和 INH 药敏结果差异无统计学意义。经 McNemar 检验, $P=1.000$ ,提示 2 种方法检验 RFP 药敏结果一致;经 McNemar 检验, $P=0.096$ ,提示 2 种方法检验 INH 药敏结果一致。

RFP 和 INH 药敏结果一致性检验, $\text{Kappa}=0.858$ ,提示 2 种方法检验 RFP 药敏结果高度一致;INH 药敏结果一致性检验, $\text{Kappa}=0.710$ ,提示 2 种方法检验 INH 药敏结果中度一致。

### 2.2 基因芯片法检测结果

应用基因芯片法检测 200 株 MTB 临床分离株 RFP 耐药基因 *rpoB* 的 6 个位点、13 种突变型,INH 耐药基因 *katG* 的 1 个位点、2 个突变型和 *INHinhA* 基因启动子 -15 位、1 个 C→T 突变型。结果集中在 6 个突变型。具体表现在:*rpoB* 基因突变位点 531 (C→T) 占 52.6%(10/19),*rpoB* 基因突变位点 526 (C→T) 占 31.6%(6/19),*rpoB* 基因突变位点 526 (C→G) 占 15.8%(3/19)。*katG* 基因突变位点 315 (G→C) 占 80.0%(16/20),*katG* 基因突变位点 315 (G→A) 占 20.0%(4/20),*inhA* 基因突变位点 -15 (C→T) 占 100.0%(17/17)。

基因芯片法检测结果,敏感株 152 株、耐药株 48 株,单耐 INH 结核菌株占 15.0%(30/200),单耐 RFP 5.5%(11/200),耐多药结核菌株占 3.5%(7/200)。罗氏比例法检测:敏感株 161 株、耐药株 39 株,单耐 INH 结核菌株占 9.5%(19/200),单耐 RFP 3.5%(7/200),耐多药结核菌株占 5.0%(10/200)。

## 3 讨论

近年来,关于结核分枝杆菌耐药的分子机制已有一定的进展<sup>[4-5]</sup>,研究发现结核分枝杆菌耐药性的产生与 *rpoB*、*katG*、*inhA*、*ahpC*、*ndh*、*rpsL*、*rrs*、*em-bCAB*、*PncA* 等基因突变有关。大量的研究证实<sup>[6]</sup>,RFP 耐药性的发生是由结核分枝杆菌编码 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基的 *rpoB* 基因突变所致。PANG 等<sup>[7]</sup>研究发现,INH 耐药突变主要集中在 *katG* 基因和 *inhA* 的启动子区域。本课题所选研究样本来自青岛市胸科医院 2013 年 1 月 -2014 年 12 月门诊和住院患者,从其痰液和肺泡灌洗液中分离培养出结核菌株,同时检测每株菌株的 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因是否存在突变。对 RFP 的 *rpoB* 突变基因进行检测,结果显示基因芯片检测和罗氏比例法药敏试验检测 RFP 耐药性有高度一致性。本研究以罗氏比例法药敏试验为金标准,基因芯片法检测 RFP 耐药的敏感性为 85.0%,与文献报道<sup>[8]</sup>相近。对 INH 的 *katG*、*inhA* 突变基因进行检测,结果显示 2 种方法检测 INH 耐药性结果中度一致,与文献报道结果相近<sup>[9]</sup>。以罗氏比例法药敏试验为金标准,通过基因芯片法检测 INH 耐药的敏感性为 82.8%,略低于文献报道<sup>[7]</sup>。本研究中 *inhA*-15(C→T)突变的菌株较多,但是 23.5%的菌株药敏结果 INH 敏感,这也说明在结核分枝杆菌的分子耐药机制中 *inhA* 突变可能是引起 INH 耐药性的一个因素,但不一定是主要因素<sup>[9]</sup>,也可能是由于存在本研究检测位点外的基因突变。陈杨等<sup>[10]</sup>报道,30 例药敏试验耐 RFP 的结核分枝杆菌中有 18 株突变分离株,其中 4 株出现 *katG* 和 *inhA* 双基因联合突变。而本实验所分离出的 200 例菌株中未发现 *inhA* 和 *katG* 基因同时突变的菌株。这需要扩大样本进一步研究。

本研究显示,耐药基因检测结果与常规药敏试验结果并非完全一致,与王巍等<sup>[11]</sup>报道的相似,一些药敏试验提示耐药菌未检出耐药基因突变,少数敏感菌却检出了耐药基因突变,这体现出 MTB 菌株体外药敏试验的局限性,也表明结核分枝杆菌耐药机制具有多样性和复杂性,需要继续去探索和发现。

本研究中 2 号菌株 315(G→A)位点突变,但罗氏药敏试验 RFP 和 INH 及其他一线药物均敏感,治疗 3 个月仍菌阳,空洞无缩小,再次痰菌培养 RFP 和 INH 仍敏感。调整治疗方案,3 个月后痰菌阴转,

空洞闭合。这也表明 2 种检测方法联合使用可及早制定出合理有效的治疗方案,以减少耐药菌在社会上的传播。

虽然传统的结核分枝杆菌药敏试验在目前的临床诊疗中尚不能被完全取代,基因芯片法仍需要进一步研究完善突变位点的检测以提高耐药基因检测率,但近年来的大量研究<sup>[7,12]</sup>显示,基因芯片技术检测结核杆菌耐药性具有很好的应用前景。本研究表明,基因芯片法检测 RFP 和 INH 耐药性结果与传统的药物敏感试验结果差异无统计学意义,结果一致性高,可缩短 15 d,具有特异性高、符合率高等特点。采用改良罗氏培养方法成本较低,可减少患者的费用,再配合基因芯片法检测耐药基因,可早期预测结核菌的耐药情况。本课题是首次针对青岛市胸科医院(青岛市结核病定点收治医院)临床分离的结核菌株进行的研究,可用于指导本地区临床,及早制定出合理的抗结核方案,同时对周围地区的结核病防治也有指导意义。

#### 参 考 文 献:

[1] 陈诚,李仁忠,陈明亭,等. 全国结核病流行病学抽样调查及各省耐药监测中耐药结核病疫情资料分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(4):

265-268.

- [2] 中华医学会. 临床诊疗指南结核病分册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [3] World Health Organization. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB. 1996.
- [4] 潘晔,何国钧. 耐多药结核病的研究与进展. 中华结核和呼吸杂志[J]. 2000, 23(2): 119-123.
- [5] 秦伟. 结核分枝杆菌的耐药机制与治疗进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11: 458-459.
- [6] ZHANG Y, YEW W W. Mechanisms of drug resistance in mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(11): 1320-1330.
- [7] PANG Y, XIA H, ZHANG Z, et al. Multicenter evaluation of genechip for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6): 1707-1713.
- [8] 刘厚明,陈建波,肖颜玉,等. 利福平和异烟肼结核分枝杆菌药敏表型和基因型的关系[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(8): 573-577.
- [9] 崔振玲,景奉香,胡忠义,等. 基因芯片检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(7): 439-441.
- [10] 陈杨,陈玲,张泓,等. 耐异烟肼结核分枝杆菌及其 katG 与 inhA 基因突变的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10): 788-792.
- [11] 王巍,李洪敏,吴雪琼,等. 结核分支杆菌五种耐药基因检测的临床应用及评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(11): 670-673.
- [12] SHI X C, LIU X Q, XIE X L, et al. Gene chip array for differentiation of mycobacterial species and detection of drug resistance[J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125(18): 3292-3297.

(张西倩 编辑)