

## · 论 著 ·

应用 PCR-反向点杂交技术快速检测结核分枝杆菌  
耐药突变基因

彭亦平 宗佩兰 辛茶香 熊国亮 胡群芳 袁小兰 史安良 姚琳 王小路 万赞燕 吴娟

**【摘要】 目的** 评价 PCR-反向点杂交技术在检测结核分枝杆菌耐药突变基因中的应用价值。**方法** 选取 2014 年 8 月至 2015 年 12 月江西省胸科医院住院的部分肺结核患者作为研究对象,共 1071 例。研究对象均送检了痰液标本,共 1071 份。所有患者均经病原学或病理学证实,或符合菌阴肺结核诊断标准。采用 PCR-反向点杂交技术对研究对象痰标本进行异烟肼(H)、利福平(R)、链霉素(S)、乙胺丁醇(E)耐药基因检测,并以痰培养阳性标本的药物敏感性试验(简称“药敏试验”)检测结果作为金标准,来验证检测结果的可靠性及评价其检测效能。**结果** PCR-反向点杂交检测的 1071 例患者中,596 例结核分枝杆菌阳性,阳性率为 55.65%。其中,218 例(36.58%)检出 H、R、S、E 耐药基因突变,分布于所测 13 个位点。H、R、S、E 最常见突变位点分别位于 *KatG* 的 315M(82.53%, 137/166)、*rpoB* 的 S531L(69.50%, 98/141)、*rpsL* 的 43M(78.65%, 70/89)、*embB* 的 306M2(55.13%, 43/78)和 306M1(39.74%, 31/78)。433 例患者标本同时行结核分枝杆菌培养,培养阳性且同时 PCR-反向点杂交检测阳性 157 例。以培养及药敏试验结果为金标准,PCR-反向点杂交法对 H、R、S、E 的耐药检测经 *Kappa* 检验具有较好的一致性(*Kappa* 值分别为 0.77、0.73、0.66、0.49);敏感度分别为 88.89%(40/45)、79.66%(47/59)、67.57%(25/37)、63.16%(12/19);特异度分别为 91.07%(102/112)、91.84%(90/98)、95.00%(114/120)、91.30%(126/138)。**结论** PCR-反向点杂交技术用于结核分枝杆菌耐药基因检测较为可靠,对早期临床用药具有较好的指导作用。

**【关键词】** 聚合酶链反应; 分枝杆菌,结核; 抗药性,细菌; 基因

**Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistant genes using PCR reverse dot blotting hybridization** PENG Yi-ping, ZONG Pei-lan, XIN Cha-xiang, XIONG Guo-liang, HU Qun-fang, YUAN Xiao-lan, SHI An-liang, YAO Lin, WANG Xiao-lu, WAN Zan-yan, WU Juan. The Third Department of Internal, Jiangxi Chest Hospital, Nanchang 330006, China  
Corresponding author: PENG Yi-ping, Email: pyp74@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the value of PCR reverse dot blotting hybridization in detecting drug-resistant gene mutation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** A total of 1071 inpatients were enrolled from Jiangxi Chest Hospital in interval between August 2014 and December 2015. All patients were with positive pathology or positive pathogeny, or identified by the criteria of pulmonary tuberculosis with negative smear or culture. PCR reverse dot blot hybridization which was used to detect *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistant genes, which were included (isoniazid (H), rifampin (R), streptomycin (S) and ethambutol (E) in 1071 sputa samples). The results were compared with result of drug susceptibility test, which usually considered as golden standard, and the efficiency was evaluated. **Results** Of the 1071 cases were detected by using PCR reverse dot blot hybridization, 596 (55.65%) were TB positive, and H, R, S or E mutant genes distributing in 13 loci were found in 218 cases (36.58%). The most common mutant-gene of H, R, S and E were *KatG*-315M (82.53%, 137/166), *rpoB*-S531L (69.50%, 98/141), *rpsL*-43M (78.65%, 70/89), *embB*-306M2 (55.13%, 43/78) and *embB*-306M1 (39.74%, 31/78), respectively. Additionally, 433 clinical samples were tested with TB culture, and 157 cases had obtained positive results in both of TB culture and dot blot hybridization. By using culture and drug sensitivity results as gold standard, PCR reverse dot blot hybridization had excellent consistency in detecting H, R, S and E compared by

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.08.004

基金项目:江西省科技计划(20151BBG70124)

作者单位:330006 南昌,江西省胸科医院内三科(彭亦平、胡群芳、史安良、姚琳、王小路、万赞燕、吴娟),内一科(宗佩兰),检验科(辛茶香、熊国亮),科教科(袁小兰)

通信作者:彭亦平,Email: pyp74@126.com

adopting *Kappa* test (*Kappa* index were 0.77, 0.73, 0.66 and 0.49, respectively). The sensitivities were 88.89% (40/45), 79.66% (47/59), 67.57% (25/37) and 63.16% (12/19), and the specificities were 91.07% (102/112), 91.84% (90/98), 95.00% (114/120) and 91.30% (126/138), respectively. **Conclusion** PCR reverse dot blot hybridization was reliable to detect the drug-resistant gene mutation of *Mycobacterium tuberculosis*, and it was helpful in drug usage guidance.

**【Key words】** Polymerase chain reaction; *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance, bacterial; Genes

PCR-反向点杂交技术是将 PCR 技术的高敏感度、反向斑点杂交技术的高特异性和膜芯片技术的高通量 3 种成熟技术的优势有效结合的快速基因诊断手段。它可同时检测 4 种一线药物的 5 个常见耐药相关基因上 13 个位点的突变,且简便快速,可直接采用痰标本进行检测,8 h 即可得出结果。本研究采用 PCR-反向点杂交技术,对江西省胸科医院住院肺结核患者的痰标本进行一线抗结核药物[异烟肼(H)、利福平(R)、链霉素(S)、乙胺丁醇(E)]的 5 个常见耐药突变基因中的 13 个位点进行检测,以了解这些基因突变的发生频率及分布特点,并以药物敏感性试验(简称“药敏试验”)作为金标准进行比较,分析其敏感度、特异度、符合率、阳性预测值、阴性预测值等指标,评价其在结核分枝杆菌快速耐药检测中的价值。

### 对象和方法

1. 对象:选取 2014 年 8 月至 2015 年 12 月江西省胸科医院住院的部分肺结核患者作为研究对象,共 1071 例。其中,男 723 例,女 348 例,年龄 19~85 岁。研究对象均送检了痰液标本,共 1071 份。所有患者均经病原学或病理学证实,或符合菌阴肺结核诊断标准。

2. 仪器与试剂:DA7600 基因扩增仪由中山大学达安基因股份有限公司提供;HR40-II A2 生物安全柜由青岛海尔公司提供;恒温杂交仪由亚能生物技术(深圳)有限公司提供;PCR-反向点杂交试剂由亚能生物技术(深圳)有限公司提供;分离培养专用酸性罗氏培养基由江西省胸科医院检验科结核分枝杆菌培养室自制。

3. PCR-反向点杂交:(1)DNA 提取及 PCR 扩增:取痰标本 3~5 ml,加等量 4% NaOH 液化 20 min,离心半径 5 cm,13 000 r/min,离心 5 min,弃上清;向沉淀中加入 1 ml 的磷酸盐缓冲液,混匀,离心半径 5 cm,10 000 r/min,离心 2 min;向沉淀中加入 50  $\mu$ l 裂解液,打匀,沸水浴 10 min,离心半径 5 cm,10 000 r/min,离心 2 min,留上清液。取出 PCR 反应管,在管壁上做好标记,离心半径 5 cm,

5000 r/min,离心 10 s,加入已提取的待测样品 DNA 4  $\mu$ l。同时取两管 PCR 反应管分别加入阳性质控品和阴性质控品 DNA,作为产品使用过程的质量控制。按说明书要求进行扩增。(2)杂交、洗膜、显示:取 15 ml 塑料离心管,放入标有患者编号的膜条,加入 AT 液(依说明书,由氯化钠、柠檬酸钠、十二烷基硫酸钠按一定比例配置)5~6 ml 及所有(25  $\mu$ l) PCR 产物,将盖拧紧,混匀。将离心管放入沸水浴中加热 10 min,取出离心管,放入分子杂交箱 59  $^{\circ}$ C 杂交 1.5 h。取 50 ml 塑料管,加入 40 ml B 液(依说明书,由氯化钠、柠檬酸钠按一定比例配置)于分子杂交箱或水浴箱中预热至 59  $^{\circ}$ C。取出膜条,移至装有预热至 59  $^{\circ}$ C B 液的 50 ml 管中,于 59  $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 15 min。按 AT 液:POD(链霉亲和素辣根过氧化物酶)=2000:1 配制孵育液,室温轻摇孵育 30 min,弃去 POD 溶液。用 AT 液室温轻摇洗 2 次,每次 5 min。用 C 液(柠檬酸钠)室温洗膜 2 min,同时配制显色液。将膜条浸泡于显色液中避光显色 5~10 min 即可观察结果。

4. 细菌培养及药敏试验:按照《结核病诊断实验室检验规程》<sup>[1]</sup>,采用改良罗氏培养法及比例法药敏试验。

5. 统计学分析:采用 SPSS 13.0 软件进行分析,PCR-反向点杂交检测与药敏试验对研究对象耐药检测结果的比较采用 McNemar 检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。对 PCR-反向点杂交检测与药敏试验检测结果进行 *Kappa* 一致性检验,*Kappa* 值 $\geq 0.75$  为两者的一致性较好,*Kappa* 值为 0.4~0.75 为一致性一般,*Kappa* 值 $<0.4$  为一致性差。符合率=(真阳性例数+真阴性例数)/检测对象总例数 $\times 100\%$ ;敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$ ;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) $\times 100\%$ ;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数) $\times 100\%$ ;阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数) $\times 100\%$ 。

### 结 果

1. PCR-反向点杂交检测结果:1071 例患者中,596 例结核分枝杆菌阳性,阳性率为 55.65%。其

中,378 例(63.42%)未检出 H、R、S、E 耐药基因突变,218 例(36.58%)检出 H、R、S、E 耐药基因突变,分布于所测 13 个位点。检测显示,R 耐药 140 例,耐药率为 23.49%(140/596);H 耐药 160 例,耐药率为 26.85%(160/596),其中 6 例同时出现 315M 和-15M 突变;S 耐药 88 例,耐药率为 14.77%(88/596),其中 1 例同时出现 43M 和 88M 突变;E 耐药 76 例,耐药率为 12.75%(76/596),其中 2 例同时出现 306M1 和 306M2 突变。各突变基因位点分布情况见表 1。

表 1 218 例经 PCR-反向点杂交检测发生耐药基因突变患者突变位点分布情况

药物突变位点	检出例次	占该药物基因突变 总检出例次的 构成比(%)
利福平		
<i>rpoB</i> D516V	6	4.26
<i>rpoB</i> D516G	11	7.80
<i>rpoB</i> H526Y	11	7.80
<i>rpoB</i> H526D	14	9.93
<i>rpoB</i> S531L	98	69.50
<i>rpoB</i> S531W	1	0.71
合计	141	100.00
异烟肼		
<i>katG</i> 315M	137	82.53
<i>inhA</i> -15M	29	17.47
合计	166	100.00
链霉素		
<i>rpsL</i> 43M	70	78.65
<i>rpsL</i> 88M	19	21.35
合计	89	100.00
乙胺丁醇		
<i>embB</i> 306M1	31	39.74
<i>embB</i> 306M2	43	55.13
<i>embB</i> 306M3	4	5.13
合计	78	100.00

注 D516V 表示 *rpoB* 基因第 516 密码子的 D 突变为 V,即天冬氨酸突变为缬氨酸。其他氨基酸含义:G-甘氨酸、H-组氨酸、Y-酪氨酸、S-丝氨酸、L-亮氨酸、W-色氨酸、T-苏氨酸、N-天冬氨酸。315M 及 -15M 分别表示 *katG* 基因第 315 密码子和 *inhA* 基因第-15 密码子的突变。43M 和 88M 分别代表 *rpsL* 基因第 43 和 88 密码子发生突变。306M1、306M2 和 306M3 代表 *embB* 基因第 306 密码子发生不同类型的突变

2. PCR-反向点杂交法与固体药敏耐药情况比较:433 例患者标本同时行结核分枝杆菌培养,培养

阳性且同时 PCR-反向点杂交检测阳性 157 例,药敏试验结果显示耐药者 74 例,其中 R 耐药 59 例,耐药率为 37.58%(59/157);H 耐药 45 例,耐药率为 28.66%(45/157);S 耐药 37 例,耐药率为 23.57%(37/157);E 耐药 19 例,耐药率为 12.10%(19/157)。以培养及药敏试验结果为金标准,经检验两种不同方法对 H、R、S、E 的耐药检测情况差异无统计学意义,经 *Kappa* 一致性检验,两种方法具有较好的一致性。结果见表 2。

## 讨 论

目前,临床上用于结核分枝杆菌耐药检测的主要方法是培养法及药敏试验,被誉为“金标准”。但此方法操作复杂、费时,一般需要 4~8 周,诊断周期长,且培养困难,敏感度低,不能及时指导用药。随着分子生物学诊断技术的不断进步,结核分枝杆菌的耐药突变基因检测得到了很快发展。PCR-反向点杂交技术是将 PCR 技术的高敏感度,反向斑点杂交技术的高特异性和膜芯片技术的高通量 3 种成熟技术的优势有效结合的快速基因诊断手段,可同时检测 4 种一线药物的 5 个常见耐药相关基因上 13 个位点的突变。并且,其与培养法及药敏试验相比,简便快速,8 h 即可得出结果。

研究表明,大部分结核分枝杆菌耐药性产生的主要原因是药物作用靶点的基因发生突变。目前已知的结核分枝杆菌针对一线药物的耐药相关基因突变包括:针对 R 耐药的 *rpoB* 耐药核心区各碱基;针对 H 的 *katG*、*inhA*、*ahpC* 和 *oxyR* 基因;针对 E 的 *embA*、*embB* 和 *embC* 基因;针对 S 的 *rrs*、*rpsL* 和 *strA* 基因等<sup>[2-4]</sup>。

本研究应用 PCR-反向点杂交法检测 1071 例肺结核患者痰标本,596 例结核分枝杆菌基因检测阳性,阳性率为 55.65%;其中,218 例发生耐药基因突变,分布于所测 13 个位点。H、R、S、E 等 4 种药物最常见的突变位点分别位于 *KatG* 的 315M、*rpoB* 的 S531L、*rpsL* 的 43M、*embB* 的 306M2 和 306M1,与文献[5-7]报道的基本相符。

在实际应用中,基因芯片技术的结核分枝杆菌耐药性检测结果具有较高的可靠性,相关文献表明其敏感度达 85.5%~100%,特异度达 100%<sup>[8-10]</sup>,但所示文献均以 PCR-直接测序为金标准。本研究采用 PCR-反向点杂交技术,同时检测 H、R、S、E 等 4 种药物,并以培养法及药敏试验为金标准进行对比。结果显示,两种方法检测结果差异无统计学意义;

表 2 PCR-反向点杂交法与药敏试验对 157 例结核分枝杆菌检测阳性患者耐药检测的比较

PCR 反向点杂交法	药敏试验							
	异烟肼(例)		利福平(例)		链霉素(例)		乙胺丁醇(例)	
	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感
耐药	40	10	47	8	25	6	12	12
敏感	5	102	12	90	12	114	7	126
$\chi^2$ 值	1.07		0.45		1.39		0.84	
P 值	0.30		0.50		0.24		0.36	
Kappa 值	0.77		0.73		0.66		0.49	
符合率(%)	90.45		87.26		88.54		89.90	
敏感度(%)	88.89		79.66		67.57		63.16	
特异度(%)	91.07		91.84		95.00		91.30	
阳性预测值(%)	80.00		85.45		80.65		50.00	
阴性预测值(%)	95.33		88.24		83.82		94.74	

kappa 一致性分析显示具有中高度一致性,其符合率均在 87% 以上。由此说明,PCR-反向点杂交技术用于结核分枝杆菌耐药基因检测具有可靠性。另外,PCR-反向点杂交技术检测耐药基因的特异度均较高(均>90%),说明其造成耐药菌误诊的可能性小;但敏感度偏低,尤其是 S(67.57%)与 E(63.16%),说明其造成耐药菌漏诊的概率较高。究其原因,可能为每种药物均有多个耐药基因及位点,本研究仅针对常见耐药基因及位点进行了检测。

综上所述,PCR-反向点杂交技术用于结核分枝杆菌耐药基因检测具有快速、可靠的优点,对早期临床用药具有指导作用;但限于检测基因的不足,造成诊断敏感度不够高。因此,有必要进一步研究尽可能包含更多突变基因的试验方法。

#### 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.
- [2] 张太松,李明. 分子诊断技术在耐多药结核分支杆菌检测中的应用进展. 分子诊断与治疗杂志,2009,1(2):129-134.
- [3] 张军. 耐药结核病分子诊断技术研究进展. 中国防痨杂志,2011,33(9):608-611.
- [4] 伍静,师长宏. 结核分枝杆菌的耐药基因及其相关分子机制. 现代生物医学进展,2011,11(22):4382-4385.
- [5] 杨辉,张国良,张明霞,等. 某地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药相关基因突变特征分析. 重庆医学,2012,41(34):3591-3593.
- [6] 周扬,欧喜超,乐军,等. 基因芯片诊断耐多药结核病的临床多中心研究. 中华检验医学杂志,2011,34(9):793-799.
- [7] 李芳芳,唐曙明,李爱敏,等. 膜芯片技术对结核分枝杆菌耐药性检测的研究. 国际检验医学杂志,2013,34(21):2792-2794.
- [8] 戎奇吉,吕火祥,孙爱华. 基因芯片快速检测结核分枝杆菌 *katG* 基因突变及其与异烟肼耐药相关性. 中国人兽共患病学报,2011,27(3):233-237.
- [9] 李锋,李泉坚,陈园园,等. 应用基因芯片快速检测结核分枝杆菌利福平耐药基因的研究. 中国防痨杂志,2011,33(3):188-189.
- [10] 张俊仙,吴雪琼,阳幼荣,等. 应用基因芯片方法检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼的耐药性. 中国防痨杂志,2011,33(10):680-685.

(收稿日期:2016-04-29)

(本文编辑:李敬文)