

基因芯片在分枝杆菌菌种鉴定及结核耐药基因检测的诊断价值^{*}

赵连爽, 代 娣, 陈 昕, 云 科, 王 倩[△] (中国医科大学附属第一医院检验科, 沈阳 110001)

【摘要】 目的 探讨基因芯片检测系统在分枝杆菌菌种鉴定及耐药基因检测中的临床应用价值。**方法** 应用基因芯片技术对疑似结核病和非结核分枝杆菌病患者的痰液、尿液、胸腹腔积液、脑脊液和穿刺液等标本进行核酸检测; 并对分枝杆菌阳性样本进行利福平及异烟肼的耐药基因检测。**结果** 91 例标本中共检出结核分枝杆菌复合群 16 例, 非结核分枝杆菌 2 例(戈登分枝杆菌 1 例、偶然分枝杆菌 1 例), 分枝杆菌检出总阳性率为 19.8%(18/91), 其中结核分枝杆菌占 17.6%(16/91), 非结核分枝杆菌占 2.2%(2/91); 不同标本类型检出阳性率有差别, 由高到低依次为穿刺脓液(33.3%)、痰液(24.0%)、胸腹腔积液(18.8%)、脑脊液(16.7%)和尿液(15.8%)。有 57 例患者同时进行了基因芯片法和涂片抗酸染色法检测, 其中芯片法有 16 例阳性, 阳性率为 28.1%(16/57), 涂片法有 3 例阳性, 阳性率为 5.3%(3/57), 两种方法比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。18 例分枝杆菌阳性标本进一步进行耐药基因检测, 有 4 例发生耐药基因突变, 其中 2 例(1 例戈登分枝杆菌)为利福平耐药相关基因, *ropB* 基因 526 位点发生 C→G 突变, 1 例为 *ropB* 基因 531 位点发生 C→T 突变, 还有 1 例为异烟肼耐药相关基因, *inhA* 基因启动子-15 位点发生 C→T 突变; 没有检测到多重耐药株。**结论** 基因芯片技术适用于不同标本类型的分枝杆菌菌种鉴定及耐药基因检测, 操作简便快速, 灵敏度高, 特异性好。

【关键词】 基因芯片; 分枝杆菌; 鉴定; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.12.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)12-1595-04

Diagnostic value of gene chip in identification of mycobacterium and detection of drug-resistant genes^{*} ZHAO Lian-shuang, WANG Qian, DAI Di, CHEN Xin, YUN Ke, WANG Qian[△] (Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang Liaoning, 110001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the diagnostic value of gene chip in identification of mycobacterium and detection of drug-resistant genes. **Methods** Gene chip technology was used in DNA detection of sputum, urine, pleural effusion, cerebrospinal fluid, and puncture fluid samples from suspected tuberculosis and nontuberculous mycobacteria patients, and positive samples of mycobacterium were detected for drug-resistant genes of mycobacterium to rifampin and isoniazid further. **Results** Among 91 samples detected, 16 cases of mycobacterium tuberculosis complex, 2 cases of nontuberculous mycobacteria (1 case of Gordon's bacillus, 1 case of mycobacterium fortuitum), the positive rate of mycobacterium was 19.8% (18/91), which the mycobacterium tuberculosis accounted for 17.6% (16/91); Mycobacterium non tuberculosis accounted for 2.2% (2/91). The positive rate of various types of samples were different, which puncture pus, sputum, pleural effusion, cerebrospinal fluid and urine accounted for 33.3%, 24%, 18.8%, 16.7% and 15.8%. 57 patients were detected by the gene chip method and mycobacterium smear acid-fast staining at the time, the chip was positive in 16 cases, the positive rate was 28.1% (16/57), smear was positive in 3 cases, the positive rate was 5.3% (3/57), there was significant difference between the two methods ($P < 0.01$). 18 cases of Mycobacterium positive samples were detected for drug-resistant genes further, 4 cases showed drug-resistant genes mutation, 2 cases (1 case Gordon mycobacteria) were *ropB* gene 526 C → G mutation, 1 case was *ropB* gene 531 C → T mutation, 1 case was *InhA* gene promoter -15 C → T mutation. Multiple resistant strains were not detected. **Conclusion** The gene chip technology can be used for mycobacterial species identification and drug-resistant genes detection in different types of samples, which is simple and rapid in procedure and have high sensitivity and good specificity.

【Key words】 gene chip; mycobacterium tuberculosis; identification; drug resistance

全球每年新发病例超过 900 万, 约 200 万人病死于结核病^[1]。中国的结核病年发病患者约为 130 万, 每年因结核病病死数达 13 万, 是仅次于印度的世界第 2 大结核病高发国家^[2]。

目前结核病控制面临的最大问题是无法在大规模的患者中准确、快速地诊断出结核病患者, 尤其是在艾滋病感染者和儿童中; 同时合并免疫功能抑制人群增多, 非结核分枝杆菌 (NTM)

^{*} 基金项目: 辽宁省社会发展基金资助项目 (2011225019)。

作者简介: 赵连爽, 男, 本科, 副主任技师, 主要从事分子诊断研究。 [△] 通讯作者, E-mail: qianwangyj@163.com。

感染也呈现增加趋势, 两者的病原菌均属于分枝杆菌属, 从形态学、涂片抗酸染色阳性上均无法区分, 但其临床表现和治疗不同。因此, NTM 和结核分枝杆菌的病原菌鉴别亟待解决。

应用 DNA 微阵列芯片检测病原菌核酸技术是近几年在医疗领域最具影响的科技发展之一, 可快速检测临床疑似标本中的分枝杆菌属 DNA^[3-4]; 并且基因芯片还可以通过检测耐药突变的存在与否协助判读结核菌种的耐药情况, 如异烟肼耐药基因 katG 和 inhA 基因启动子及利福平耐药基因 rpoB 等常见突变位点^[5]。为评价基因芯片技术在分枝杆菌菌种鉴定及耐药基因检测中的临床应用价值, 本文回顾性分析 91 例临床疑似结核和非结核分枝杆菌病患者检测数据, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 2 月至 2013 年 3 月中国医科大学附属第一医院门诊就诊及住院的疑似结核病患者, 标本类型有痰液、24 h 尿液沉渣、胸腹腔积液、脑脊液和局部穿刺液。其中男性 45 例, 女性 46 例, 年龄 11~85 岁, 平均年龄 51.4 岁。

1.2 仪器与试剂 应用北京博奥生物有限公司生产的分枝杆菌菌种鉴定芯片、结核分枝杆菌耐药基因检测芯片及 LuxScan10K-B 微阵列芯片扫描仪等配套仪器进行检测。

1.3 方法 应用芯片检测 17 种分枝杆菌, 包括结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌、戈登分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、偶然分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、土分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌、不产色分枝杆菌、草分枝杆菌、海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌和玛尔摩分枝杆菌、金色分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、耻垢分枝杆菌。

结核分枝杆菌耐药基因检测包括利福平 rpoB 基因的 6 个位点, 异烟肼 KatG 及 inhA 基因启动子各 1 个位点。

1.3.1 标本处理 液化根据标本类型不同, 液化液(40 mL 液化液配方: N-乙酰半胱氨酸 0.2 g, 8% 柠檬酸钠 20 mL, 10% 氢氧化钠 8 mL, 去离子水 12 mL) 的添加量也不同, 37 ℃ 30 min 或更长时间, 直到标本完全液化; 灭活, 85 ℃, 30 min。

1.3.2 核酸提取 取适量标本于 1.5 mL EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加 1 mL 生理盐水, 混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 80 μL 核酸提取液, 混匀, 转入核酸提取管中涡旋振荡 5 min, 95 ℃ 干浴 5 min, 8 000 r/min 离心 3 min, 备用。

1.3.3 PCR 扩增 分枝杆菌菌种鉴定扩增程序: 200 μL 的 EP 管中加入 18 μL 扩增液, 再加入 2 μL DNA 样品, 混匀, 瞬时离心。扩增条件: 37 ℃ 10 min; 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 30 s; 60 ℃ 30 s; 72 ℃ 60 s, 45 个循环; 94 ℃ 30 s; 72 ℃ 60 s, 10 个循环; 72 ℃ 7 min。结核耐药基因检测扩增程序: 3 个 200 μL 的 EP 管中分别加入 18 μL 扩增液 1、2、3, 再分别加入 2 μL DNA 样品, 混匀, 瞬时离心。扩增条件: 37 ℃ 10 min; 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 30 s; 60 ℃ 30 s; 72 ℃ 60 s, 35 个循环; 94 ℃ 30 s; 72 ℃ 40 s, 10 个循环; 72 ℃ 7 min。

1.3.4 芯片杂交及洗涤 扩增产物 95 ℃ 变性 5 min 后, 取出立即冰水浴 3 min。分枝杆菌菌种鉴定杂交程序: 取 6 μL 扩增产物加入到 9 μL 杂交缓冲液中, 混匀, 取 13.5 μL 杂交液加入到一个芯片位点上, 密封后放入杂交仪中, 5 r/min, 50 ℃ 杂交 2 h。结核耐药基因检测杂交程序: 2 个 200 μL EP 管中分别加入 9 μL 杂交缓冲液, 1 管中加入扩增产物 1 和扩增产物 2 各

3 μL(利福平耐药基因), 另 1 管中加入扩增产物 1 和扩增产物 3 各 3 μL(异烟肼耐药基因), 混匀, 瞬时离心; 各取 13.5 μL 杂交混合液加入到芯片的 2 个位点上(利福平耐药基因位点为 1、3, 异烟肼耐药基因位点为 2、4), 密封后放入杂交仪中, 5 r/min, 50 ℃ 杂交 2 h。结束后取出, 放入洗干仪中洗涤, 洗涤之后甩干。

1.3.5 芯片扫描 使用 Lux Scan 10K-B 微阵列芯片扫描仪进行芯片扫描, 并运行相应的配套检测芯片判别系统分析荧光信号的强度及结果判读。

1.4 统计学处理 数据统计分析采用 SPSS 18.0 软件完成, 分类计数资料用率来进行描述。采用配对 χ^2 检验比较基因芯片法和抗酸染色法在分枝杆菌鉴定方面差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分枝杆菌菌种鉴定结果 91 例标本中结核分枝杆菌复合群阳性 16 例, 非结核分枝杆菌 2 例(1 例戈登分枝杆菌、1 例偶然分枝杆菌), 分枝杆菌检出阳性率为 19.8%(18/91), 其中结核分枝杆菌占 17.6%; 非结核分枝杆菌占 2.2%, 非结核分枝杆菌占分枝杆菌总数的 11.1%。

2.2 不同类型标本分枝杆菌检测阳性率 2 例胸腹腔积液阳性患者为免疫力低下人群, 其中 1 例为艾滋病感染者, 另 1 例为肾移植患者。有 4 例标本(尿液 3 例、痰液 1 例)的结果显示, 检测系统自动判读为阴性, 但分枝杆菌内对照探针(IC)阳性, 结核分枝杆菌复合群荧光信号值处于“灰区”, 结核菌素皮肤试验(TST)结果为阳性, 疑为潜伏性结核感染, 建议患者定期复检。本组中有 57 例患者同时进行了基因芯片法和涂片抗酸染色法检测, 其中芯片法有 16 例阳性, 阳性率为 28.1%(16/57), 涂片法有 3 例阳性, 阳性率为 5.3%(3/57), 两种方法比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 55 例芯片鉴定结果为阴性的患者, 通过培养或涂片检查找到阳性致病菌 30 例, 阳性检出率为 54.6%(30/55)。检测期间 5 例分枝杆菌阳性质控品作为标本进行了随机检测, 检测结果均为结核分枝杆菌复合群阳性。见表 1、2。

表 1 基因芯片法和抗酸染色法检测结果比较(n)

抗酸染色法	基因芯片法		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	3	0	3
阴性(-)	13	41	54
合计	16	41	57

注: 2 种方法比较, $P < 0.01$ 。

2.3 分枝杆菌耐药基因检测结果 18 例分枝杆菌阳性标本进一步进行耐药基因检测, 有 4 例发生耐药基因突变, 耐药率为 22.2%, 其中 2 例(1 例戈登分枝杆菌)为利福平耐药相关基因, ropB 基因 526 位点发生 C→G 突变, 1 例为 ropB 基因 531 位点发生 C→T 突变; 1 例为异烟肼耐药相关基因 inhA 基因启动子-15 位点 C→T 突变; 没有检测到多重耐药株。

2.4 基因芯片分枝杆菌菌种鉴定及分枝杆菌耐药基因检测结果的判读 16 例结核分枝杆菌复合群判读结果见图 1, 1 例痰液的戈登分枝杆菌判读结果见图 2, 1 例面部局部化脓感染组织穿刺液的偶然分枝杆菌判读结果见图 3。

表 2 芯片检测阳性率、阳性患者临床及影像学资料[n(%)]

标本	n	芯片阳性率	临床及影像学资料
穿刺脓液	6	2(33.3)	1 例患者面部注射美容,致面部皮下脂肪化脓性改变;1 例左侧腮腺及颊部占位病变,考虑为恶性。
痰液	25	6(24.0)	5 例结核病报卡,其中 2 例右肺上叶病灶、空洞,1 例右肺下叶炎性病变,2 例双肺炎性改变;1 例外院高度怀疑结核病,并且结核耐药基因检测呈阳性。
胸腹水	16	3(18.8)	1 例为结核病报卡,合并 HIV、梅毒感染;1 例为肝硬化患者,右肺中叶小斑片影,心包、腹腔积液;1 例为肝移植患者,结核耐药基因检测呈阳性。
脑脊液	6	1(16.7)	患者为结核病报卡患者,抗酸染色 2 次阴性。左肺炎性病变,双肺小结节,淋巴结增大。
尿液	38	6(15.8)	2 例结核病报卡,其中 1 例左侧泌尿系感染伴肾盂和输尿管积液扩张,1 例左肾结石伴输尿管管壁、膀胱壁弥漫性增厚,炎性改变;1 例输尿管末端占位,经术后病理证实为结核病;3 例为右侧(2 例)或双侧肾积水病变。

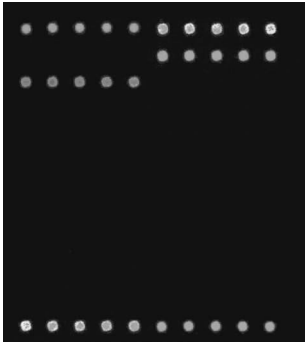


图 1 结核分枝杆菌复合群检测结果



图 2 戈登分枝杆菌检测结果

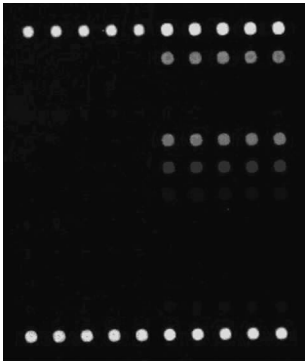


图 3 偶然分枝杆菌检测结果

3 讨 论

基因芯片技术始创于 20 世纪 90 年代初,Gingeras 等^[6]利用结核菌 rpoB 基因保守区 705 bp 特异核苷酸序列探针与基因芯片杂交,对 10 种 121 株分枝杆菌进行基因分型与种属鉴定。Troesch 等^[7]根据 16S rRNA 和 rpoB 基因序列,应用基因

芯片鉴定出 70 株 27 种不同菌种的分枝杆菌的临床分离株和 15 株耐利福平菌株,结果正确地鉴定 27 个种属中的 26 个,而且检测出所有耐利福平的 15 株结核分枝杆菌 rpoB 突变基因。崔振玲等^[8]用芯片检测耐异烟肼分离株 katG、ahpC 和 inhA 调节区域的基因突变。单万水等^[9]报道 35 株耐利福平结核菌中有 91.4%用直接测序法检测出存在 rpoB 基因突变。

本研究将基因芯片技术用于多种类型标本的检测,检测结果显示基因芯片不仅可对痰液、分泌物或穿刺脓液等结核分枝杆菌浓度较高的标本进行检测,也适用于尿液、穿刺液(胸腹水、脑脊液、心包液等)等标本,不需要培养即可进行直接检测,检测的灵敏度为 1×10^3 个菌/PCR 反应。本研究中 91 例临床疑似结核和非结核分枝杆菌病患者标本共检出分枝杆菌 18 例,阳性率 19.8%;不同类型标本阳性检出率存在差异,穿刺脓液阳性率(33.3%)最高,其他依次为痰液(24.0%)、胸腹腔积液(18.8%)、脑脊液(16.7%)和尿液(15.8%)。其中有 4 例患者(3 例痰液、1 例尿液)既往诊断为结核病,本组芯片检测结果为阴性。分枝杆菌检出率与疾病的进程、标本与病灶部位的关联程度相关,也与标本的留取质量、液化剂使用量、液化时间控制等因素相关。尿液、脑脊液、胸腹腔积液等标本因细菌浓度较低,为提高检出率,需要合适处理标本。痰标本以清晨第一口痰为宜,先用清水漱口,嘱患者用力咳出深部的、黏稠的痰于无菌容器中送检,加入 1~2 mL 的液化液,稀薄的、含有唾液的痰为不合格。尿液标本用无菌容器收集 24 h 尿液,取沉淀部分 30~40 mL 送检,送检后应尽快以 3 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液,留取 1~2 mL 沉淀,加入同体积的液化液 30 min 后处理;心包液和胸腹腔积液因为蛋白含量高,标本容易凝固,添加 1/3 或 1/4 体积的液化液,待充分液化后离心,取沉淀 1~2 mL 后处理;脑脊液标本量应大于或等于 2 mL,离心后取沉淀;胆汁及其他量少但浓稠的穿刺液应大于或等于 1 mL,加入 1~2 mL 的液化液 30 min,混匀后离心去上清液处理。标本的正确留取、合理的处理是保证阳性检出率的先决条件,必须高度重视。

2 例非结核分枝杆菌感染的患者情况如下:1 例为 57 岁女性,入院诊断为不明原因发热和支气管扩张。痰液细菌培养阴性,涂片抗酸染色阴性;CT 显示右肺上叶病灶,结核可能性大,不能除外占位性病变;传染病报卡为结核病。痰液芯片检测结果为戈登分枝杆菌(图 2),此标本经北京博奥生物有限公司测序证实为戈登分枝杆菌。另 1 例为 22 岁女性,入院诊断为面部感染,病史为面部美容注射药物后出现皮下脓肿。脓肿

组织细菌培养为非结核分枝杆菌快速生长群,脓液涂片抗酸染色阴性,X线胸片正常。面部彩超显示皮下脂肪炎性改变,局部化脓改变。面部穿刺液芯片检测结果为偶然分枝杆菌(图3)。近年来随着非结核分枝杆菌病疫情呈现上升的趋势,偶然分枝杆菌造成皮肤或软组织感染在国内时有报道,并且医源性感染病例较多。

近年来,利福平和异烟肼的耐药机制研究得到了快速的发展,大部分利福平耐药性是由 *ropB* 上长度为 81 bp 的核心区域存在基因突变造成。另外,通过对大量高水平耐异烟肼菌株的研究发现,50%~90%的耐药株在 *katG315* 位点存在突变,20%~35%的耐药株在 *inhA* 基因调节区有突变,对这些耐药突变位点的认识使分子诊断方法应用于临床标本检测成为现实^[10]。本研究 18 例分枝杆菌阳性标本中,有 4 例检测到耐药基因突变,占 22.2%,与刘申等^[11]报道的耐药率 22.5%相近。本研究 2 例(1 例戈登分枝杆菌)为利福平耐药相关基因 *ropB* 基因 526 位点发生 C→G 突变;1 例为 *ropB* 基因 531 位点发生 C→T 突变,1 例为异烟肼耐药相关基因 *inhA* 基因启动子-15 位发生 C→T 突变,没有检测出多药耐药株。

分枝杆菌菌种鉴定和结核分枝杆菌耐药基因检测的灵敏度均为 1×10^3 个菌/PCR 反应,菌种鉴定需要 6~7 h,结核耐药基因检测需要 7~8 h,2 d 内即可完成临床疑似标本的鉴定及耐药性分析,极大地缩短了检测时间,满足了临床快速检测的需求。本检测方法还采用 31 种其他常见呼吸道细菌及与分枝杆菌亲缘关系较近的细菌标准株样本对所用试剂进行了特异性评价,结果显示各样本的检测结果均与理论判读结果一致,表明试剂具有较高的特异性,能够有效地区分出 17 种分枝杆菌之外的样本。但当本检测结果为“无分枝杆菌”时,并不能排除被检者带有其他种类的分枝杆菌。

参考文献

[1] World Health Organization. Tuberculosis[M]. Geneva: World Health Organization,2008.
[2] World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Epidemiology, Strategy, Financing [M]. Geneva: World Health Organization,2009.

[3] Ahmad S,Mokaddas E. Recent advances in the diagnosis and treatment of multidrug-resistant tuberculosis[J]. Respir Med,2009,103(12):1777-1790.
[4] Zhu L,Jiang G,Wang S,et al. Biochip system for rapid and accurate identification of mycobacterial species from isolates and sputum[J]. J Clin Microbiol,2010,48(10):3654-3660.
[5] Guo Y,Zhou Y,Wang C,et al. Rapid,accurate determination of multidrug resistance in M. tuberculosis isolates and sputum using a biochip system[J]. Int J Tuberc Lung Dis,2009,13(7):914-920.
[6] Gingeras TR,Ghandour G,Wang E,et al. Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic Mycobacterium DNA arrays[J]. Genome Res,1998,8(5):435-448.
[7] Troesch A,Nguyen H,Miyada CG,et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with highdensity DNA probe arrays[J]. J Clin Microbiol,1999,37(1):49-55.
[8] 崔振玲,景奉香,胡忠义,等. 用 DNA 芯片快速检测结核分枝杆菌对异烟肼的耐药性[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(4):244.
[9] 单万水,金岚,能勇,等. DNA 芯片快速检测耐利福平结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(11):680-682.
[10] Zhang M,Yue J,Yang YP,et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from China[J]. J Clin Microbiol,2005,43(11):5477-5482.
[11] 刘申,刘智勇,黄庆,等. 基因芯片检测系统在分枝杆菌属鉴定及耐药性分析的临床应用[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(10):1959-1962.

(收稿日期:2013-11-12 修回日期:2014-05-03)

(上接第 1594 页)

papillomavirus,and risk of cervical cancer;a pooled analysis of 26 epidemiological studies[J]. Lancet Oncol,2011,12(11):1023-1031.
[7] 刘国强,李辉腾. 高危型人乳头状瘤病毒检测联合宫颈液基细胞学检查在宫颈疾病筛查中的临床价值[J]. 检验医学与临床,2012,9(24):3117-3118.
[8] 周权,黄民主,黄霜,等. 中国已婚妇女宫颈癌发病影响因素 Meta 分析[J]. 中国癌症杂志,2011,21(2):125-129.
[9] 王又又,向群英,余茜,等. 宫颈癌高发区妇女 HPV 感染

及影响因素分析[J]. 中国公共卫生,2011,27(3):259-261.

[10] Krajden M,Cook D,Yu A,et al. Assessment of HPV 16 and HPV 18 antibody responses by pseudovirus neutralization,Merck cLIA and Merck total IgG LIA immunoassays in a reduced dosage quadrivalent HPV vaccine trial[J]. Vaccine,2013,29(13):1234-1236.

(收稿日期:2013-10-29 修回日期:2013-12-28)