

本文引用: 崔俊伟, 蔡瑞艳, 王永亮. 分子线性探针杂交法在结核分枝杆菌耐药性快速检测中的应用价值[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(10): 920-923. DOI: 10.7683/xxxyxb.2017.10.014.

【临床研究】

# 分子线性探针杂交法在结核分枝杆菌耐药性快速检测中的应用价值

崔俊伟, 蔡瑞艳, 王永亮  
(新乡医学院第一附属医院结核内一科, 河南 卫辉 453100)

**摘要:** **目的** 探讨分子线性探针杂交法在快速检测结核分枝杆菌耐药性中的效果。**方法** 选择新乡医学院第一附属医院住院治疗的结核患者的临床标本 750 例, 其中结核分枝杆菌临床分离株 190 例, 痰涂片阳性标本 560 例。所有临床标本分别采用传统方法及分子线性探针杂交法进行检测, 对 2 种方法检测的异烟肼 (INH) 和利福平 (RFP) 的耐药结果进行比较, 采用分子线性探针杂交法对耐药菌株进行基因分型, 分析 INH 及 RFP 耐药相关突变位点情况。**结果** 传统方法检测中, 560 例痰涂片阳性标本中共检测出结核分枝杆菌 454 例, 其对 INH、RFP 耐药率分别为 15.0% (68/454)、17.8% (81/454), 190 例结核分枝杆菌临床分离株对 INH、RFP 的耐药率分别为 26.8% (51/190)、18.4% (35/190); 传统方法检测的结核分枝杆菌对 INH、RFP 的耐药率分别为 18.5% (119/644)、18.0% (116/644)。分子线性探针杂交法检测 454 例结核分枝杆菌对 INH、RFP 的耐药率分别为 14.1% (64/454)、17.6% (80/454), 190 例结核分枝杆菌临床分离株对 INH、RFP 的耐药率分别为 23.2% (44/190)、16.3% (31/190); 分子线性探针杂交法检测的对 INH、RFP 的总耐药率分别为 16.8% (108/644)、17.2% (111/644)。2 种方法检出的结核分枝杆菌对 INH、RFP 的耐药率比较差异无统计学意义 (INH:  $\chi^2 = 0.140, 0.691, 0.650$ ; RFP:  $\chi^2 = 0.011, 0.293, 0.131$ ;  $P > 0.05$ )。分子线性探针杂交法检测中, 对 INH 和 RFP 的灵敏度、特异度分别为 85.7%、98.9% 和 90.5%、98.9%, 其中 katG-S315T1 为 INH 耐药主要突变位点, 约占 88.9%, rpoB-S531L 为 RFP 耐药主要突变位点, 约占 81.1%。**结论** 分子线性探针杂交法能够快速检测出结核菌株和痰标本中结核分枝杆菌的耐药性, 并能对耐药基因进行分型, 减少药物敏感性试验的时间, 并能根据药物敏感性结果尽快采取有效的治疗方案。

**关键词:** 分子线性探针杂交法; 结核分枝杆菌; 快速检测; 耐药性  
**中图分类号:** R521 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2017)10-0920-04

## Application value of molecular linear probe hybridization in rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*

CUI Jun-wei, CAI Rui-yan, WANG Yong-liang  
(Department of No. 1 Tuberculosis, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the application value of molecular linear probe hybridization in rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** Seven hundred and fifty clinical samples of patients with tuberculosis were selected from the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, including 190 cases of clinical isolation of *Mycobacterium tuberculosis* and 560 cases of sputum smear positive samples. All the samples were detected by traditional method and molecular linear probe hybridization respectively. The results of drug resistance test of isoniazid (INH) and rifampicin (RFP) detected by the two methods were compared, the genotyping of drug resistant strain were detected by molecular linear probe hybridization and resistance related mutable site of INH and RFP were analyzed. **Results** By the traditional method, four hundred and fifty-four cases of *Mycobacterium tuberculosis* were detected in 560 cases of sputum smear positive specimens, the drug resistance rate of INH and RFP was 15.0% (68/454) and 17.8% (81/454) respectively. The drug resistance rate of INH and RFP in the four hundred and fifty-four cases of *Mycobacterium tuberculosis* was 26.8% (51/190) and 18.4% (35/190) respectively in 190 cases of clinical isolation of *Mycobacterium tuberculosis*, the total drug resistance rate of INH and RFP was 18.5% (119/644) and 18.0% (116/644) respectively. By the method of molecular linear probe hybridization, the drug resistance rate of INH and RFP of 454 cases of *Mycobacterium tuberculosis* was 14.1% (64/454) and 17.6% (80/454) respectively, the drug resistance rate of INH and RFP was 23.2% (44/190) and 16.3% (31/190) respectively in 190 cases of clinical isolation of *Mycobacterium tuberculosis*, the total drug resistance rate of INH and RFP was 16.8% (108/644) and

17.2% (111/644) respectively. There was no significant difference in the drug resistance rates between the two methods (INH; $\chi^2=0.140,0.691,0.650$ ;RFP; $\chi^2=0.011,0.293,0.131$ ;  $P>0.05$ ). The sensitivity and specificity of INH and RFP was 85.7%,98.9% and 98.9% respectively in the detection of molecular linear probe hybridization, among them, katG-S315T1 was the main mutation sites of INH,accounting for about 88.9%,and rpoB-S531L was the main mutation site of RFP, accounting for about 81.1%. **Conclusion** Molecular linear probe hybridization is able to quickly detect the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens,and it is able to decrease the time of drug sensitivity test by classifying the drug resistant genes,doctors can take effective treatment plan as soon as possible according to drug sensitivity results.

**Key words:** molecular linear probe hybridization;*Mycobacterium tuberculosis*;rapid detection;drug resistance

目前,治疗结核病的主要药物有异烟肼(isonicotinylhydrazide,INH)和利福平(rifampicin,RFP),但有文献报道,约1/4的结核分离株对INH和RFP产生了耐药性<sup>[1]</sup>。因此,在临床治疗前,需要对结核分枝杆菌的耐药性进行检测。目前,临床上多采用罗氏培养加药物敏感性试验的方法进行耐多药肺结核的诊断,该方法耗时长,导致耐多药肺结核诊断不及时,病情得不到控制,使用现有的化学治疗方案可能会进一步扩大耐药谱,因此,寻找一种快速检测结核分枝杆菌耐药性的方法显得尤为重要。随着结核分枝杆菌耐药分子机制的不断研究,通过采用聚合酶链式反应-核酸杂交-酶显色技术对结核分枝杆菌复合群保守序列进行鉴定,根据katG、rpoB、inhA的基因突变情况对INH和RFP的耐药性表型进行评估,该技术能够直接对菌株和标本进行检测,敏感度和特异度较高<sup>[2]</sup>。本研究通过对190例结核分枝杆菌临床分离株及560例痰涂阳性标本分别采用分子线性探针杂交法和传统方法进行检测,并对2种方法的检测效果进行评价,现报道如下。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集2014年3月至2016年3月在新乡医学院第一附属医院住院的结核患者的临床标本750例,其中人型结核分枝杆菌临床分离株190例,痰涂片阳性标本560例。质控菌株由本院检验科保存。

**1.2 主要仪器与试剂** 聚合酶链式反应扩增仪(上海创萌生物科技有限公司),GT-Blot 20全自动杂交仪(上海百傲科技有限公司)。聚合酶链式反应扩增试剂盒(上海创萌生物科技有限公司),罗氏改良培养基(上海古朵生物科技有限公),Geno Type MTBDRplus 试剂盒(德国 Hain 生命科学公司)。

**1.3 检测方法** 收集的所有临床标本分别采用传统方法及分子线性探针杂交方法进行检测。传统方法中选择罗氏改良培养基对菌株进行培养分离,并根据中国防痨协会制定的方法<sup>[1]</sup>鉴定菌种。鉴定菌群采用对硝基甲苯酸/噻吩-2-羧酸肼试验,临床

分离菌株的耐药性检测采用比例法<sup>[1]</sup>,若药物培养基菌落数/对照培养基菌落数超过1%则表明待测菌株耐药。分子线性探针杂交法根据说明书进行操作,主要步骤为:(1)超声波水浴破菌,采用煮沸法对DNA进行提取;(2)聚合酶链式反应扩增模板;(3)扩增产物予以杂交显色;(4)评价实验结果。对实验结果的评价主要有:(1)对杂交条带显色进行观察,与扩增质控带强度相同或更强的条带可评价为阳性,结核分枝杆菌复合群显示阳性,说明待测菌为结核分枝杆菌;3种耐药基因质控带显示阳性,说明耐药基因检测有效。(2)katG、rpoB、inhA野生型探针条带阳性,说明检测区内无可检测出的突变,待测菌株对相应的抗生素敏感,如缺失存在至少1个野生型探针信号时,说明待测菌株对相应的抗生素有耐药情况。(3)菌株存在耐药表型,但同时分子线性探针杂交后缺失存在至少有1个野生型探针,而突变型探针全部显示为阴性,说明存在未知突变,无法对具体突变位点进行评价<sup>[3]</sup>。

**1.4 统计学处理** 应用SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理,2种方法检测效能的比较采用 $\chi^2$ 检验,  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 传统方法和分子线性探针杂交法检测结果比较** 传统方法检测中,560例痰涂片阳性标本经培养阴性62例(11.1%);非结核分枝杆菌44例(7.9%),结核分枝杆菌454例(81.0%)。454例痰涂片阳性分离株对INH耐药68例(15.0%),对RFP耐药81例(17.8%);190例结核分枝杆菌临床分离株对INH耐药51例(26.8%),对RFP耐药35例(18.4%);传统方法检测结核分枝杆菌对INH的总耐药率为18.5%(119/644),对RFP的总耐药率为18.0%(116/644)。

分子线性探针杂交法检测中,560例痰涂片阳性标本,62例培养阴性和44例非结核分枝杆菌经分子线性探针杂交法进行检测发现,质控带和扩增质控带显色,而结核分枝杆菌复合群质控带不显色,

说明分子线性探针杂交法结果也显示为阴性,与传统方法检测结果一致率为 100% (106/106)。454 例结核分枝杆菌药物敏感性试验结果显示,对 INH 耐药 64 例(14.1%),对 RFP 耐药 80 例(17.6%);190 例结核分枝杆菌临床分离株对 INH 耐药 44 例(23.2%),对 RFP 耐药 31 例(16.3%)。分子线性探针杂交法检测的结核分枝杆菌对 INH 和 RFP 的总耐药率分别为 16.8% (108/644)、17.2% (111/644)。分子线性探针杂交法检测的结核分枝杆菌对 INH 和 RFP 的耐药率与传统方法检测 454 例痰涂片阳性分离株、190 例结核分枝杆菌临床分率株

表 1 受检标本对 INH 及 RFP 灵敏度、特异度、阳性符合率及阴性符合率检测情况

Tab.1 Sensitivity,specificity,positive coincident rate and negative coincidence rate of INH and RFP in the tested specimens

标本	n	灵敏度/%	特异度/%	阳性符合率/%	阴性符合率/%	总诊断符合率/%
痰涂片阳性标本	454					
INH		88.2	99.0	93.8	97.9	97.4
RFP		92.6	98.7	93.8	98.4	97.6
结核分枝杆菌临床分离株	190					
INH		82.4	98.6	95.5	93.8	94.2
RFP		85.7	99.4	96.8	96.9	96.8
合计	664					
INH		85.7	98.9	94.4	96.8	96.4
RFP		90.5	98.9	94.6	97.9	97.4

2.3 分子线性探针杂交法中 INH 及 RFP 耐药相关突变位点情况 108 例对 INH 耐药患者相关突变位点分别为 katG-S315T1、katG-C15T、inhA-A16G、inhA-S315T2,其中,以 katG-S315T1 为主要突变位点,约占 88.9% (96/108);111 例对 RFP 耐药患者相关突变位点分别为 rpoB-S531L、rpoB-D516V、rpoB-H526Y、rpoB-H526D,其中,rpoB-S531L 为主要突变位点,约占 81.1% (89/111)。

3 讨论

结核分枝杆菌生长缓慢,其从临床标本中分离及培养大概需要 1.5 个月,而进行传统的药物敏感性试验在此基础上需再花费 1 个月,从而不能及时采取有效的治疗方案来指导临床治疗。随着结核分枝杆菌耐药机制的深入研究,有研究显示,结核分枝杆菌的耐药发生主要与其基因突变存在一定的联系<sup>[4]</sup>。且有文献报道称,INH 耐药相关基因主要有 katG、inhA、ahpC、oxyR 等,80% 以上的 INH 耐药菌株能够在以上基因的 INH 耐药决定区域的基因片段中发现突变。而 RFP 耐药基因主要有 rpoB 基因,95% 以上对 RFP 耐药菌株能够在 rpoB 基因的 RFP 耐药决定区域的基因片段中发现突变<sup>[3]</sup>。

聚合酶链式反应能够对结核分枝杆菌进行快速检测,并对其药物敏感性进行评价。国外有文献报道称,分子线性探针杂交法能够在鉴定结核分枝杆菌

对 INH 和 RFP 的耐药率及其总耐药率比较差异均无统计学意义(INH: $\chi^2=0.140、0.691、0.650$ ;RFP: $\chi^2=0.011、0.293、0.131$ ;  $P>0.05$ )。

2.2 分子线性探针杂交方法的灵敏度、特异度、阳性符合率、阴性符合率、总诊断符合率 以传统比例法结果作为参考,分子线性探针杂交法检测的结核分枝杆菌对 INH 灵敏度、特异度、阳性符合率、阴性符合率、总诊断符合率分别为 85.7%、98.9%、94.4%、96.8% 和 96.4%,对 RFP 的灵敏度、特异度、阳性符合率、阴性符合率及总诊断符合率分别为 90.5%、98.9%、94.6%、97.9%、97.4%;见表 1。

的过程中,对其 katG、rpoB、inhA 相关基因进行检测<sup>[5]</sup>。同时,还有调查报道称,分子线性探针杂交法在对 INH 及 RFP 的临床检测中,其药物敏感度分别为 75% ~ 96% 和 80% ~ 86%<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,通过采取分子线性探针杂交法对 560 例痰涂阳性标本进行检测,62 例培养阴性和 44 例非结核分枝杆菌经线性探针杂交法进行检测发现均显示为阴性,与传统检测方法结果一致率为 100%。而通过分子线性探针杂交法对结核分枝杆菌检测时,454 例结核分枝杆菌对 INH 及 RFP 耐药率分别为 14.1% 和 17.6%,与传统检测方法的结果比较差异无统计学意义。且灵敏度均在 80% 以上,特异度均在 98.5% 以上,与传统方法检测的抗结核药物敏感性试验比较具有较好的准确性和一致性。而对 190 例结核分枝杆菌临床分离株进行检测时,其对 INH 及 RFP 耐药率分别为 23.2% 和 16.3%,与传统检测方法的结果比较差异无统计学意义。且灵敏度均在 85% 以上,特异度均在 98.5% 以上,与传统方法检测的抗结核药物药敏性试验比较具有较好的准确性和一致性。

有研究显示,katG-S315T1 为 INH 耐药菌株中最常见的基因突变位点,约占总例数的 85.2%<sup>[7]</sup>;同时,还有调查报告显示,rpoB-S531L 在亚洲地区的突变频率为 16.1% ~ 39.5%,约占总例数的 83.0%<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,通过分子线性探针杂交法检测发现,108 例对 INH 耐药患者以 katG-S315T1 为主要

突变位点,约占 88.9%,111 例对 RFP 耐药患者以 rpoB-S531L 为主要突变位点,约占 81.1%。与上述文献报道结果<sup>[7-8]</sup>较为一致。

分子线性探针杂交法主要应用于基因型,而并不能完全代表耐药表型<sup>[9]</sup>。但采用分子线性探针杂交法对 INH 及 RFP 的药物敏感性进行评价,且能对临床标本和临床分离株进行直接检测,操作便捷,较传统检测方法大大减少了检测时间,从而能够迅速选择和决定用药方案,使患者病情得到有效控制,并降低了耐药菌株的扩散发生率,因此,分子线性探针杂交法属于一种较为迅速、灵敏及特异的结核分枝杆菌检测方法,临床推广价值较大。

参考文献:

[1] 申阿东,焦伟伟. 儿童结核病的流行及耐药现状[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(4):269-271.

[2] CAFÉ OLIVEIRA L N, MUNIZ-SOBRINHO JDA S, VIANA-MAGNO L A, et al. Detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Brazil using a multimarker genetic assay for katG and rpoB genes[J]. *Braz J Infect Dis*, 2016, 20(2): 166-172.

[3] ASANTE-POKU A, OTCHERE I D, DANSO E, et al. Evaluation of GenoType MTBDRplus for the rapid detection of drug-resistant tuberculosis in Ghana[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015, 19(8):954-

959.

[4] HOMORODEAN D, POP C M, JODAL A M, et al. The concordance between phenotypic and genotypic *M. tuberculosis* drug susceptibility tests results: observational study [J]. *Pneumologia*, 2015, 64(2):26-29.

[5] SINGH A, GOPINATH K, SHARMA P, et al. Comparative proteomic analysis of sequential isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from a patient with pulmonary tuberculosis turning from drug sensitive to multidrug resistant[J]. *Indian J Med Res*, 2015, 141(1):27-45.

[6] RAMASUBBAN G, THERESE K L, LAKSHMIPATHY D, et al. Detection of novel and reported mutations in the rpoB, katG and inhA genes in multidrug-resistant tuberculosis isolates: a hospital-based study[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2015, 3(1):1-4.

[7] THAKUR C, KUMAR V, GUPTA A K. Detecting mutation pattern of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Himachal Pradesh using GenoType® MTBDRplus assay[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2015, 33(4):547-553.

[8] AUNG W W, EI P W, NYUNT W W, et al. Phenotypic and genotypic analysis of anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar[J]. *Ann Lab Med*, 2015, 35(5):494-499.

[9] SINGHAL R, MYNEEDU V P, ARORA J, et al. Early detection of multi-drug resistance and common mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Delhi using GenoType MTBDRplus assay [J]. *Indian J Med Microbiol*, 2015, 33(Suppl1):46-52.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

(上接第 919 页)

[5] TAMAKI K, MORIYA T, SATO Y, et al. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(1):88-94.

[6] KOSAKA T, MIYAZAKI Y, MIYAJIMA A, et al. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(10):2123-2129.

[7] MIYAZAKI Y, KOSAKA T, MIKAMI S, et al. The prognostic significance of vasohibin-1 expression in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(15):4145-4153.

[8] 李剑,童希文,韩永香,等. Survivin mRNA 和 p53 蛋白在肺癌组织中的表达[J]. 新乡医学院学报, 2017, 34(2):147-150.

[9] SHIMIZU K, WATANABE K, YAMASHITA H, et al. Gene regulation of a novel angiogenesis inhibitor, vasohibin, in endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(3):700-706.

[10] SATO Y, SONODA H. The vasohibin family: a negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(1):37-41.

[11] KIMURA H, MIYASHITA H, SUZUKI Y, et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis [J]. *Blood*, 2009, 113(19):4810-4818.

[12] HEISHI T, HOSAKA T, SUZUKI Y, et al. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum antilymphangio-

genic activity and suppresses lymph node metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(4):1950-1958.

[13] LU C, HAN H D, MANGALA L S, et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2[J]. *Cancer Cell*, 2010, 18(2):185-197.

[14] ZHAO G, YANG Y, TANG Y, et al. Reduced expression of vasohibin-1 is associated with clinicopathological features in renal cell carcinoma[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(5):3325-3334.

[15] YOSHINAGA K, ITO K, MORIYA T, et al. Roles of intrinsic angiogenesis inhibitor, vasohibin, in cervical carcinomas[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(2):446-451.

[16] 李丹,董宇. 早产儿视网膜病变发病基础及抗 VEGF 药物治疗进展[J]. 眼科新进展, 2016, 36(4):396-400.

[17] ZAMAN K, DRISCOLL R, HAHN D, et al. Monitoring multiple angiogenesis-related molecules in the blood of cancer patients shows a correlation between VEGF-A and MMP-9 levels before treatment and divergent changes after surgical vs conservative therapy[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(3):755-764.

[18] 贾如江,侯丽艳,尹清臣,等. 轴突诱导因子 4D 和血管内皮生长因子在胰腺癌组织中的表达[J]. 新乡医学院学报, 2016, 33(11):950-953.

[19] LUO K J, HU Y, WEN J, et al. CyclinD1, p53, E-cadherin, and VEGF discordant expression in paired regional metastatic lymph nodes of esophageal squamous cell carcinoma: a tissue array analysis[J]. *J Surg Oncol*, 2011, 104(3):236-243.

( 本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟 月)