

· 临床检验研究论著 ·

基因检测及 MODS 技术快速诊断结核分枝杆菌对左氧氟沙星的敏感性研究*

陈俊林, 顾德林, 施军卫, 朱培华

(江苏省南通市第六人民医院结核科 226013)

摘要:目的 探讨基因检测技术和显微镜观察药物敏感度检测技术(MODS)对结核分枝杆菌(MTB)耐左氧氟沙星(LFX)快速诊断价值。方法 选取 MTB 标准株(H37Rv)和 32 株耐 LFX 临床分离株,行 gyrA 基因喹诺酮类药物耐药决定区(QRDR)序列测定,同时,用 24 孔细胞培养板进行 MTB 液体药敏检测。结果 基因检测结果显示,H37Rv 未发生 gyrA 基因突变;与 H37Rv 株序列的差异比较显示,29 株耐 LFX 临床株发生了有义突变,突变率 90.6%。MODS 与 罗氏绝对浓度法药敏(L-J)比较,H37Rv 完全相符;32 株耐 LFX 临床分离株,相符 31 株,不符 1 株,符合率为 96.9%。结论 gyrA 基因突变检测可作为快速诊断结核分枝杆菌对 LFX 敏感性的一种方法,但不能完全区别低耐药和高耐药而使用受到限制。MODS 技术检测 LFX 耐药性具有快速、操作简便、灵敏度和特异性高等优点,可作为结核分枝杆菌对 LFX 敏感性的快速检测新方法。

关键词:分枝杆菌,结核; 左氧氟沙星; 敏感性试验; 基因突变; 显微镜观察药物敏感性技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)13-1554-02

Rapid diagnosis of levofloxacin resistance in Mycobacterium tuberculosis by gene detection and microscopic observation drug susceptibility*

Chen Junlin, Gu Delin, Shi Junwei, Zhu Peihua

(Department of Tuberculosis Medical, Nantong Sixth People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226013, China)

Abstract: Objective To study the value of gene detection and microscopic observation drug susceptibility for rapid diagnosis of levofloxacin(LFX) resistance in Mycobacterium tuberculosis(MTB). **Methods** H37Rv and 32 clinical isolates of LFX-resistant tuberculosis were studied. The gyrA genes were identified and the corresponding quinolone resistance determining region(QRDR) was sequenced. 24-hole cell culture plate was used to detect the susceptibility of MTB to drugs in liquid medium. **Results** Gene mutation wasn't found in H37Rv. 29 isolates showed gyrA mutations and the mutation rate was 90.6%. Among the 32 MTB isolates resistant, 31 isolates showed resistance to LFX and the concordance rates of susceptibility between MODS and L-J was 96.9%. **Conclusion** The GyrA mutation detection could be a rapid diagnosis method of LFX resistance in MTB, but could not totally identify low resistance and high resistance. MODS assay could be used for rapid screening of LFX resistance in MTB.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; levofloxacin; sensitivity tests; gene mutation; microscopic observation drug susceptibility assay

结核分枝杆菌(MTB)耐药性问题日趋严重,据中国 2007~2008 年在全国范围开展的结核病耐药基线调查结果显示,近 1/3 肺结核患者为耐药结核,8.32% 以上患者为耐多药结核。喹诺酮类药物包括左氧氟沙星(LFX)具有良好的抗结核性能,在耐多药结核的治疗中起到了重要的作用,但因为无序及不规范用药,已出现了大量对 LFX 耐药的结核菌株^[1]。为避免无效用药,临床迫切需要开展 LFX 的耐药性检测。由于传统的药敏检测方法需时较长,远不能满足临床诊治的需求,因此,使用新的、快速的结核分枝杆菌 LFX 耐药性检测技术显得十分重要。本研究将基因检测技术和显微镜观察药物敏感性检测技术(MODS)对 MTB 的 LFX 敏感性快速诊断进行了研究分析,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 MTB 临床分离株 32 株 MTB 临床分离株均为本院收治的肺结核患者痰标本分离、筛选出的耐 LFX 菌株,其中 2 株单耐 LFX,7 株为多耐药,23 株为耐多药;H37Rv 为实验对照用标准 MTB 菌株,购自国家菌种保存中心。

1.1.2 药物及配置 将左氧氟沙星药粉(扬子江药业)配置成浓度为 10 mg/mL 的药液后,再将配置好的药液无菌滤膜过滤,分装,-20℃ 保存。应用时取出,常温下溶解,配置成所需浓度。

1.1.3 培养基 PNB 鉴别培养基、TCH 鉴别培养基、改良罗氏培养基、改良 7H9 液体培养基均按《结核病诊断细菌学检验规程》由本院制备^[2]。

1.1.4 仪器 PCR 仪(Bio-RAD)、倒置显微镜、24 孔细胞培养板(TPP 上海肺科医院引进)。

1.2 方法 痰标本 MTB 的分离、培养与鉴定参照《结核病诊断细菌学检验规程》^[2]。应用改良罗氏培养基法检测收集的对 LFX 耐药的 MTB 临床分离株 32 株,其中对 LFX 低耐药 21 株,对 LFX 高耐药 11 株。酶及缓冲液、dNTP 购于 TAKARA 公司。H37Rv 和耐 LFX 的 MTB 临床分离株 DNA 提取与 gyrA 目的片段 528 bp 的扩增、测序。采用经典的方法提取 MTB 全染色体 DNA 作为模板,基因扩增在美国 ABI 2720 thermo cycler PCR 仪器上进行,引物由上海生物工程公司合成,引物序列为 P1:5'-GCG CGG CGC AGC TTT ATC AC-3'(正向引

* 基金项目:2010 年江苏省南通市社会发展科技计划项目(S2010038)。

物)、P2: 5'-AGC ACC GTC GGC TCT TGC AC-3'(反向引物)。热循环为 95 °C 预变性 1 min, 然后按 95 °C 15 s, 65 °C 15 s, 72 °C 30 s, 循环 30 个周期, 再 72 °C 延长 7 min 后, 在 2% 琼脂凝胶中电泳检测 PCR 产物。PCR 产物纯化和测序工作由上海华大基因完成, 结果与标准株 H37Rv *gyrA* 基因相比。MODS 检测 MTB 对 LFX 耐药性参照文献方法^[3], 每株待检菌株检测时设置两个阴性对照孔, 两个阳性对照孔, 20 个含药孔。将待检菌株磨菌后调整浊度至 1 个麦氏单位, 10⁻³ 稀释, 在对照孔和含药孔内分别加入待检菌液 0.4 mL, 然后分别加入 0.4 mL LFX 药液, LFX 药物终浓度选择实验分别采用 0.062 5~12.0 μg/mL 系列梯度倍比稀释。将 24 孔细胞培养板用胶带密封, 放置密封的塑料袋内, 放入 37 °C 的温箱培养, 自孵育后第 3 天在倒置显微镜下开始观察(×400), 每天观察 1 次, 4~7 d 判断药敏结果, 如果对照孔内观察到索状结构生长, 加药孔内无索状结构生长, 判定该菌株为敏感株; 如加药孔内有索状结构生长, 判定该菌株为耐药株。每次实验均设 H37Rv 为质控株。

2 结 果

2.1 H37Rv 测序结果与 H37Rv 标准图谱一致, 未见基因突变。32 株耐 LFX 的 MTB 菌株测序结果显示, 32 株均有 21 位密码子 CGA-CCA(Arg-Pro) 突变及 95 位密码子 AGC-ACC(Ser-Thr) 突变。对 LFX 低耐药的 21 株菌株中, 3 株只有 95 位密码子 AGC-ACC(Ser-Thr) 突变; 2 株同时有 90 位 GCG-GTG(Ala-Val) 突变, 2 株同时有 94 位 GAC-CAC(Asp-His) 突变, 5 株同时 94 位 GAC-AAC(Asp-Asn) 突变, 5 株同时有 94 位 GAC-GGC(Asp-Gly) 突变, 4 株同时有 94 位 GAC-GCC(Asp-Ala) 突变。11 株对 LFX 高耐药株中, 2 株同时有 90 位 GCG-GTG(Ala-Val) 突变, 3 株同时有 94 位 GAC-GGC(Asp-Gly) 突变, 2 株同时有 94 位 GAC-GCC(Asp-Ala) 突变, 2 株同时有 94 位 GAC-TAC(Asp-Tyr) 突变, 1 株同时有 91 位 TCG-CCG(Ser-Pro) 突变。除外 21 位密码子 CGA-CCA 突变及 95 位密码子 AGC-ACC 突变考虑为正常突变, 均未发现双突变, 见表 1。

表 1 H37Rv 及 32 株临床分离株序列分析结果

菌株种类	氨基酸突变位点及核酸突变模式
H37Rv	无突变
低耐药 3 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC
低耐药 2 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-CAC
低耐药 4 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-GGC
低耐药 5 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-GCC
低耐药 5 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-AAC
低耐药 2 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 90 位 GCG-GTG
高耐药 2 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 90 位 GCG-GTG
高耐药 3 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-GGC
高耐药 2 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-GCC
高耐药 2 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 94 位 GAC-TAC
高耐药 1 株	21 位 CGA-CCA, 95 位 AGC-ACC, 91 位 TCG-CCG

2.2 MODS 技术检测结果并与罗氏绝对浓度法结果进行比较, 采用 MODS 技术检测 32 株 MTB 菌株 LFX 耐药性, 其中 30 株在 7 d 内均获得药敏结果, 而罗氏药敏 4~6 周才能判定

结果。细胞培养板改良 7H9 液体培养基条件下 LFX 的 MIC 为 0.25 μg/mL, 低耐药设定值大于 1.0 μg/mL, 高耐药设定值大于 4.0 μg/mL, 两法药敏结果相符 31 株, 符合率 96.9%(31/32)。不符合的 1 株为罗氏绝对浓度法低耐药, 而 MODS 技术检测判定为敏感。

3 讨 论

由于 LFX 具有良好的抗结核菌活性, 目前被世界卫生组织推荐作为主要的抗结核药物在耐药和耐多药结核病患者中使用^[4]。众所周知, LFX 被作为高效广谱抗菌剂已广泛应用于临床多年, 甚至到了滥用的程度。随着 LFX 的无序及不规范使用, 其对 MTB 的耐药性也逐渐显现出来, 有资料统计耐多药菌株中 LFX 耐药率超过一半以上, 这种现状下, 如何尽早获知结核菌株对 LFX 耐药的重要性和必要性不言而喻。本文选择已获得罗氏培养药敏鉴定的耐 LFX 的 MTB 菌株作为检测对象, 利用基因检测方法和显微镜观察药物敏感性检测技术进行了快速检测, 并就检测结果、方法学的优劣及作为适宜技术推广价值进行简单分析。

基因检测的依据是 LFX 主要通过抑制 DNA 旋转酶 A (*gyrase A*) 亚单位与 DNA 的结合, 从而抑制结核菌 DNA 的复制与表达, 达到对 MTB 的杀灭作用。*gyrA* 是 DNA 旋转酶 A 亚单位的编码基因, 它的突变导致 LFX 无法与 DNA 旋转酶 A 亚单位结合, 使 MTB 对 LFX 产生耐药^[5]。基因检测结果提示, H37Rv 未发生 *gyrA* 基因突变, 与 H37Rv 株序列的差异比较显示, 32 株耐 LFX 临床株 21 位密码子 CGA-CCA 及 95 位密码子 AGC-ACC 均发生突变, 考虑为正常突变。29 株耐 LFX 临床株发生了有义突变, 分别在第 90、91 和 94 位密码子上, 突变率为 90.6%, 未发现在同一株 MTB 上存在 *gyrA* 双突变的情况。从突变点位及核酸突变模式看, 未能发现低耐药株和高耐药株有明显差异, 因此不能从基因突变检测方法来完全区别低耐药和高耐药。本实验中有 3 株 LFX 耐药株未发现 *gyrA* 突变, 提示 *gyrA* 突变不是 MTB 耐氟喹诺酮类药物惟一的机制, 可能是 *gyrB* 突变、细菌对喹诺酮类通透性降低、细菌对药物主动外排增强等, 本文未进行相关检测^[6]。

MODS 的依据是 MTB 在液体培养基中快速生长会有特征性索状结构的形成, 该结构较容易在显微镜下被观察到^[7]。MODS 技术是近几年研究较多的一种快速诊断 MTB 耐药性表型的新方法, 已被证明检测快速、成本低廉、敏感性及特异性和常规药物敏感实验高度一致、重复性好^[8-9]。本实验利用 MODS 技术检测 32 株 MTB 菌株 LFX 耐药性, 其中 30 株在 7 d 内均获得药敏结果, 和罗氏药敏结果比较, 时间上明显缩短。两种方法药敏结果相符 31 株, 符合率极高(96.9%), 且低耐药及高耐药检测结果也与罗氏药敏结果高度一致。

从方法学角度看, 基因检测及 MODS 技术对 MTB 菌株 LFX 耐药性诊断都能达到快速检测要求, 且与罗氏药敏结果符合率也较高。但就本实验提供 MTB 菌株基因检测结果看, MTB 菌株 LFX 耐药性还不能完全用基因突变解释, 也不能从基因突变检测方法来完全区别低耐药和高耐药, 且基因检测实验要求高, 专用设备不是一般实验室能具备的, 批量检测成本较低而单个检测比较麻烦。MODS 技术检测 MTB 菌株 LFX 耐药性, 与罗氏药敏结果高度一致, 在时间、检测成本方面占有绝对优势, 能在基层实验室推广应用。快速、准确检测到对 LFX 低耐药 MTB 菌株, 有利于及时更换有效的抗结核药物, 例如莫西沙星对 LFX 低耐药的 MTB 菌株(下转第 1558 页)

性波动,所以很难确定 HBeAg 阴性与 HBV 复制水平的相关性,因此抗病毒疗效采用 HBeAg 作为指标,并不是最理想的^[6]。

本实验测定 56 例抗病毒治疗有效的乙型肝炎患者血清的 HBV-LP 与 HBV DNA 拷贝数,两者间存在良好的正相关性($r=0.94$),HBeAg 阳性组与 HBeAg 阴性组均具有 HBV-LP 与 HBV DNA 的高阳性率,两组的 $P>0.05$,差异无统计学意义,因此,HBeAg 阴性患者的机体内仍有病毒的复制,与国内外文献报道的一致^[7-9]。

本研究选择 56 例抗病毒治疗有效的系列血清,分 HBeAg 阳性组及阴性组,同时测定 HBV-LP 和 HBV DNA,可见,HBV-LP 的 A 值与 HBV DNA 同步下降。HBV-LP 本身具有反式激活病毒再复制作用,即能反映 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者体内 HBV DNA 复制的情况,也可以反映 HBeAg 阴性病毒复制的情况,因此,检测 HBV-LP 有利于对 HBV DNA 复制情况的评估,以及进行治疗时的疗效评估,表明 HBV-LP 是抗病毒治疗疗效判定较好指标。

参考文献

[1] 谢冬英,林炳亮,徐启桓,等. 基线 HBeAg 水平对 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎阿德福韦酯治疗 52 周疗效的预测价值[J]. 中华临床医师杂志,2010,4(8):1251-1255.

[2] 施前锋,王叶萍. HBeAg 阴性慢性肝炎患者血清乙型肝炎病毒外膜大蛋白检测分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2009,23(2):135-137.

[3] 陈晓明,杨美芳,薛寒,等. 乙型肝炎病毒大蛋白和 DNA 在抗病毒中变化[J]. 中华传染病杂志,2007,25(7):405-407.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 肝脏,2000,5(4):257-262.

[5] 徐爱芳,陈刚,王妙婵,等. 慢性乙型肝炎外周血 HBV-LHBs 反式激活功能与抗病毒疗效关系的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2009,23(5):375-377.

[6] 赵蕊,李鲁平. 乙肝病毒外膜大蛋白的临床检测及其意义[J]. 中国热带医学,2008,8(10):1851-1852.

[7] 吴正林,刘玢,肖棒初,等. 乙型肝炎病毒表面大蛋白与 HBV DNA 检测的对比研究[J]. 中华实验诊断学,2007,11(4):479-481.

[8] 庄鹏,吴正林,刘键,等. 慢性 HBV 患者血清乙肝病毒表面大蛋白检测与临床意义[J]. 广东医学,2009,30(2):211-212.

[9] 王立军,孙燕,付海平. 乙肝病毒 YMDD 变异与乙型肝炎病毒大蛋白相关性的探讨[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2010,24(1):48-49.

(收稿日期:2011-12-25)

(上接第 1555 页)

敏感^[10],可考虑替换。

本文选择已获得罗氏药敏鉴定的耐 LFX 的 MTB 菌株作为检测对象便于观察对照,因选例有限,结果难免有偏差,有待大样本数据完善结论。从前景看,如果痰标本前处理得当,应用基因检测及 MODS 技术能对涂片阳性标本直接进行 LFX 敏感性检测,但 MODS 技术更有可能成为快速、便捷、实用的 MTB 菌株 LFX 耐药性检测新方法。

参考文献

[1] 崔振玲,王洁,陆俊梅,等. 结核分枝杆菌临床分离株对三种氟喹诺酮类药物敏感性分析研究[J]. 中华临床医师杂志,2009,12(3):1-4.

[2] 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[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006:46-49.

[3] 付佑辉,郑瑞娟,王洁,等. 显微镜观察药物敏感度检测技术在二线抗结核药耐药性检测中应用[J]. 中华检验医学杂志,2010,33(1):25-29.

[4] 彭卫生,王英年,肖成志. 新编结核病学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2003:463-465.

[5] Alangaden GJ,Manavathu EK,Vakulenko SB,et al. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of Mycobacterium tuberculosis selected in the laboratory and isolated from patients[J]. Antimicrob Agents Chemother. 1995, 39(8):1700-1703.

[6] Pasca MR, Gugliera P, Arcesi F, et al. Rv2686c-Rv2687-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother. 2004,48(8):3175-3178.

[7] Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in sputum by microscopic observation of broth cultures[J]. Clin Microbiol, 2000,38(3):1203-1208.

[8] Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, et al. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2007,45(4):1093-1097.

[9] 金文国,郑瑞娟,王洁,等. 显微镜观察药物敏感性试验检测结核杆菌的耐药性[J]. 中华预防医学杂志,2009,43(1):24-27.

[10] 李国利,陈澎,孙昌文,等. 结核分枝杆菌对左氧氟沙星与莫西沙星的交叉耐药性及 gyrA 和 gyrB 基因突变分析[J]. 中国防痨杂志,2010,32(10):616-621.

(收稿日期:2012-02-01)