

• 论 著 •

荧光 PCR 熔解曲线法在结核分枝杆菌耐药检测中的临床应用

王冰冰, 郭明日, 肖红侠, 张 立
(天津市海河医院检验科, 天津 300350)

摘 要:目的 评价荧光 PCR 熔解曲线法在结核分枝杆菌耐药检出中的临床应用价值。方法 以改良罗氏培养法及绝对浓度法作为对比, 利用荧光 PCR 熔解曲线法检测 53 例肺结核患者对利福平、异烟肼耐药情况。结果 两种方法的单耐药率、耐药率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。同一标本两种方法检测对比显示, 与绝对浓度法相比, 熔解曲线法检测利福平、异烟肼耐药的敏感度分别为 80.0% 和 81.0%, 特异度分别为 100.0% 和 93.8%, 准确度分别为 92.2% 和 86.8%, 两种方检测法的一致性分析 Kappa 值分别为 0.754 和 0.710, 表明两者一致性佳。结论 相对于传统方法, 熔解曲线法敏感度、特异度良好且安全、高效, 在耐药肺结核治疗中有良好的应用价值。

关键词: 结核分枝杆菌; 耐药肺结核; 熔解曲线法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.014

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0608-03

Application of fluorescence PCR melting curve method in drug-resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*

Wang Bingbing, Guo Mingri, Xiao Hongxia, Zhang Li

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical application value of fluorescence PCR melting curve method in the drug-resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** With the Lowenstein-Jensen culture method and the absolute concentration method as the comparison, the fluorescent PCR melting curve method was used to detect the resistance to rifampin and isoniazid in 53 cases of pulmonary tuberculosis (TB) respectively. **Results** The single drug resistance rates and multidrug resistance (MDR) rate detected by the two methods had no significant statistical difference ($P>0.05$). The comparison between the two methods for detecting the same sample showed that compared with the absolute concentration method, the sensitivity and specificity of the melting curve method for detecting rifampin-resistance, isoniazid-resistance were 80.0% and 81.0%, 100.0% and 93.8% respectively, the accuracies were 92.2% and 86.8% respectively, the Kappa values in the consistency analysis of the two methods were 0.754 and 0.710 respectively, indicating the good consistency between them. **Conclusion** Compared with the traditional methods, the melting curve method has good sensitivity and good specificity with safety, high efficiency and good application value in the treatment of drug-resistant pulmonary TB.

Key words: mycobacterium tuberculosis; drug-resistant tuberculosis; melting curve method

结核病是严重危害人类健康的呼吸道传染病, 尽管近年来新发结核患者整体呈下降趋势, 但由于人群基数大及疾病严重的危害性, 在发展中国家结核病仍旧是重要的公共卫生问题^[1]。更为重要的是, 耐药结核病的形势在中国又十分严峻^[2-3], 因此有效、快速鉴别耐药结核菌就成为当前临床中重要而迫切的问题。传统的耐药结核菌的诊断依赖结核分枝杆菌培养及药物敏感试验。作为结核病诊断的金标准, 结核分枝杆菌培养对实验室的生物安全级别要求高, 加上细菌生长缓慢, 培养耗时长(2~6 周)。药物敏感试验也有对实验室要求高及耗时长的缺点。因此, 寻求快速诊断活动性结核病和耐药结核病的方法成为控制结核病尤为重要。荧光 PCR 熔解曲线法是日前快速检测结核分枝杆菌耐药的新型分子学方法。荧光 PCR 熔解曲线法一般耗时 3 h 左右, 明显缩短了检测时间。为了探讨其在结核菌耐药中的应用价值, 以结核分枝杆菌改良罗氏培养及绝对浓度法做药敏试验为参照, 分别检测异烟肼和利福平耐药情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 6~12 月就诊天津市海河医院的肺结核患者 53 例, 结核分枝杆菌改良罗氏培养培养阳性及药物

敏感性试验者。

1.2 方法

1.2.1 标本留取 对收集的阳性肺结核病患者的痰标本进行分离培养, 痰标本分离培养按照《结核病诊断实验室检验规程》进行。

1.2.2 结核分枝杆菌培养及药敏方法 采用改良罗氏培养法及绝对浓度法药敏试验, 分离培养结核分枝杆菌, 并常规行药物敏感性检测。

1.2.3 荧光 PCR 熔解曲线法 严格按照厦门致善生物科技有限公司结核分枝杆菌利福平、异烟肼耐药突变试剂盒说明书操作。固体培养基上生长的结核分枝杆菌, 用 22SWG 标准接种环收集菌株 1 环, 悬在 250 μ L TB DNA 提取液中, 99 $^{\circ}$ C 加热 20 min, 14 000 $\times$ g 离心 10 min, 吸取 5 μ L 上清液, 加入到含 20 μ L PCR 反应液的反应管中, 放入 ABI7500 实时荧光 PCR 扩增仪(美国, ABI 公司)进行扩增和熔解分析。PCR 反应程序: 尿嘧啶糖苷酶(UNG)去污染处理 50 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环; 预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环; Touchdown 循环 95 $^{\circ}$ C 15 s, 70 $^{\circ}$ C 20 s (每个循环下降 1 $^{\circ}$ C), 76 $^{\circ}$ C 25 s, 13 个循环; PCR 循环程序 95 $^{\circ}$ C 15 s, 57 $^{\circ}$ C 20 s, 76 $^{\circ}$ C 25 s, 42 个循环。熔解分析:

95 ℃ 2 min, 40 ℃ 2 min, 45~85 ℃ (设置在此阶段每 1 ℃ 采集 FAM 和 TET 通道荧光信号), 1 个循环。

1.2.4 结果判读 当样本的熔解温度(T_m)与阳性对照的 T_m 一致(误差不超过 1 ℃)时判定为野生型, 即试验菌株对利福平/异烟肼敏感; 样本的 T_m 低于阳性对照 2 ℃ 及以上时判定为突变型, 即试验菌株对利福平/异烟肼耐药。

2 结 果

两种方法对利福平、异烟肼单耐药情况显示绝对浓度法检出对利福平 10 例耐药, 43 例敏感, 熔解曲线法检出 8 例耐药, 43 例敏感(2 例未检出结果)($\chi^2=0.184, P=0.668$); 绝对浓度法检测对异烟肼 20 例耐药, 33 例敏感, 熔解曲线法检出 17 例耐异烟肼, 36 例敏感($\chi^2=0.374, P=0.541$)。绝对浓度法检出同时异烟肼、利福平耐多药 9 例(耐多药率 17%), 熔解曲线法检出耐多药 8 例(耐多药率 15.7%)。同一标本应用两种方法检测结果显示 39 例对利福平同时敏感, 8 例同时耐药, 4 例熔解曲线显示敏感而绝对浓度法显示耐药, 两种方法对利福平检测敏感度 80.0%, 特异度 100%, 准确度 92.2%, $Kappa=0.754$ 。31 例对异烟肼同时敏感, 15 例同时耐药。4 例绝对浓度法对异烟肼耐药, 而熔解曲线敏感, 3 例熔解曲线法对异烟肼耐药, 绝对浓度法敏感。两种方法敏感度 81.0%, 特异度 93.8%, 准确度 86.8%, $Kappa=0.710$ 。

3 讨 论

耐药性肺结核, 尤其是耐多药肺结核和广泛耐药性肺结核是结核病防治的重要障碍^[4]。调查显示, 在我国 34.2% 的新诊断病例和 54.5% 治疗后病例存在至对一种一线抗结核药耐药, 5.7% 新发病例和 25.6% 治疗后病例存在耐多药^[5]。异烟肼、利福平是抗结核化疗中的一线用药。利福平耐药是耐多药的重要线索, 因为近 90% 的利福平耐药菌株同时对异烟肼耐药^[6]。对异烟肼和利福平有耐药性的结核杆菌(耐多药结核病)所需疗程长得多, 而效果欠佳。结核分枝杆菌快速、正确的药物敏感性检测技术是耐多药患者早期发现的可靠保证, 也为提高耐多药患者治愈率和减少耐药结核流行起到一定作用。及时准确的检测耐药情况, 并进一步指导临床治疗十分重要。

结核分枝杆菌耐药原因是由于基因、药物激活基因的启动子突变或者是药物靶点序列发生了突变^[7]。利福平耐药主要发生在 *ropB* 基因中一个大小为 81 个碱基对的利福平耐药决定区(RRDR), 95% 以上的利福平耐药与此有关。结核杆菌耐利福平机制研究显示, 利福平能抑制结核杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶活性, RNA 聚合酶失活引起转录停止, 结核杆菌生长不能继续; 而结核杆菌 RNA 聚合酶亚基编码 *rpoB* 基因发生突变后能解除利福平对 RNA 聚合酶的抑制作用, 使得利福平失去抗结核作用, 产生耐药性。其中大部分的利福平耐药菌都是由于编码 RNA 聚合酶 b 亚基(*rpoB*) 基因(RNA polymerase subunit gene) 某个特定区域发生突变^[8], 从而不再与 RFP 结合而产生耐药性。

与利福平耐药相比, 异烟肼耐药更为复杂, 与 *katG*、*inhA*、*ahpC*、*ndh* 等基因中的 1 个或多个突变有关, 其中 *katG* 基因的变异(包括突变、缺失、插入等)导致的结核分枝杆菌触酶过氧化物酶活性降低或缺失, 有研究认为 50%~90% 异烟肼耐药与 *katG* 突变有关, 是导致异烟肼耐药的主要原因^[9]。

耐药结核分枝杆菌的鉴别方法多种, 传统的罗氏法或改良罗氏分离培养结核分枝杆菌方法培养及进一步的药敏时间耗时较长, 并且需要较高的防护要求, 期间可能已经应用了不敏感的抗菌药物, 从而导致预后差或者导致产生耐药菌株。因此

快速、准确的体外药物敏感性方法在临床治疗中尤为重要。分子学方法检测结核分枝杆菌耐药的优势是有效地缩短了检测时间。

目前有关对结核分枝杆菌耐药性快速分子诊断方法多种, 如反向斑点杂交法、聚合酶链式反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)、聚合酶链式反应-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)等, 但这些方法多耗时长、步骤繁杂、容易产生污染, 不利于临床广泛使用。荧光 PCR 熔解曲线法的原理是在一定环境下, DNA 双链在其长度和序列一定时, 熔点(T_m 值)也一定, 当发生错配时, T_m 值下降, 下降的幅度与发生错配的碱基数目、类型和位置有关。在 PCR 体系中加入两端分别标记有荧光基团与淬灭基团的探针, 在 PCR 过程中扩增出与探针序列互补的单链寡核苷酸序列, 在扩增完成后增加熔解曲线分析过程, 同时实时监测荧光值的变化, 通过计算荧光值与温度的负导数, 可获得探针与该序列杂交产物的熔解曲线, 并得出熔点 T_m 值, 从而推得该序列突变信息。该方法在临床上也作为结核菌耐药筛查方法^[10]。PCR 熔解曲线法全程耗时约 3 h, 为闭管操作, 即扩增、判定结果均在同一个管内实现, 能有效避免污染及人为因素干扰, 另外该方法一次可以检测 48 个标本(含对照物), 极大提高了效率。

本研究以绝对浓度法药敏试验为标准, 分别检测了利福平、异烟肼耐药情况, 结果显示两种方法的单耐药率和耐多药率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。同一标本两种方法检测对比显示, 与绝对浓度法相比, 熔解曲线法检测利福平、异烟肼耐药的敏感度分别为 80.0% 和 81.0%, 特异度分别为 100.0% 和 93.8%, 准确度分别为 92.2% 和 86.8%, 两种方法检测法的一致性分析 $Kappa$ 值分别为 0.754 和 0.710, 表明两种检测方法的一致性良好。研究中药物敏感性试验中 53 例利福平耐药, 熔解曲线法检出 43 例敏感, 8 例耐药, 2 例标本未检出, 原因可能 RRDR 区域以外的 DNA 发生突变或其他机制导致的耐药^[11]。

荧光 PCR 溶解曲线法作为快速筛查结核分枝杆菌耐药的分子学方法, 虽然与标准的方法相比不完全一致, 且检测的基因位点有限, 但因其良好的敏感度和特异度, 节约时间、安全高效, 是临床检验及诊治耐药结核的有效手段。

参考文献

- [1] Frieden TR, Brudney KF, Harries AD. Global tuberculosis: perspectives, prospects, and priorities[J]. JAMA, 2014, 312(14): 1393-1394.
- [2] Shi D, Li H, Zhao Y, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis, Central China, 2007-2009[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(11): 1904-1905.
- [3] 杨立涛, 苑雪芹. 88 株耐异烟肼分支杆菌耐药模式分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 31(11): 1058-1059.
- [4] Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, et al. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis[J]. The Lancet, 2010, 375(9728): 1830-1843.
- [5] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. New Engl J Med, 2012, 366(23): 2161-2170.
- [6] Somoskovi A, Parsons LM, Salfinger M. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in Mycobacterium tuberculosis[J]. Respir Res, 2001, 2(3): 164-168.
- [7] Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria[J]. Clin Chem, 2001, 47(5): 809-814.

(下转第 612 页)

表 4 铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的
耐药率及敏感率(%)

抗菌药物	n	耐药率	敏感率
复方磺胺甲噁唑	138	94.2	2.2
头孢噻肟	163	71.2	0.6
头孢曲松	147	70.1	4.1
庆大霉素	162	60.5	35.2
左旋氧氟沙星	155	56.1	38.1
亚胺培南	170	53.5	43.5
头孢哌酮	170	50.6	34.1
环丙沙星	162	49.4	45.1
哌拉西林	167	49.1	50.9
美洛培南	160	43.8	47.5
阿米卡星	170	43.5	50.0
氨曲南	169	39.6	41.4
头孢吡肟	158	34.8	41.8
头孢他啶	169	32.0	41.4
哌拉西林/他唑巴坦	78	26.9	70.5
头孢哌酮/舒巴坦	155	17.4	56.8

2.2.5 耐甲氧西林葡萄球菌的检出率 葡萄球菌中耐甲氧西林葡萄球菌的检出率为 74.6%，其中 MRSA 占到金黄色葡萄球菌的 63%，MRCNS 占到凝固酶阴性葡萄球菌的 76.2%。

3 讨 论

从分析致病菌的分布以及耐药性结果可以看出，不同医院分离病原菌的分布及耐药情况各不相同^[1-4]，所以抗菌药物的选择最好根据本医院的实际情况，建立本院感染病原菌的细菌谱和药敏谱^[5]，从而方便临床医生选择敏感、有效的抗菌药物。分析外科病区患者致病菌的分布及抗菌药物的耐药状况，可为临床医生经验用药提供依据。

本院外科病区五年分离病原菌以革兰阴性菌为主(55%)，革兰阴性菌中主要以大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌为主，与其他医院分离致病菌的文献^[6]资料比较接近。革兰阴性菌中铜绿假单胞菌呈明显的下降趋势，从 2007、2008 年的第 1 位下降为第 2 位，肠杆菌科的大肠埃希菌上升为第 1 位，但分离株数与以前基本持平，没有明显增加。肺炎克雷伯菌在 2011 年居于第 3 位。革兰阳性菌占到 36%，金黄色葡萄球菌位于总检出率的第 3 位，在革兰阳性菌中检出率最高。其中 MRSA 占到金黄色葡萄球菌的 63%，略高于文献^[1]报道。凝固酶阴性葡萄球菌中 MRCNS 占到 76.2%。表现出较高的耐药现象。真菌的检出率有上升的趋势，达到 10%左右。其中白色念珠菌占分离真菌的第 1 位。

目前，多重耐药菌已经成为医院感染的重要病原菌，严重影响患者的治疗效果。本院外科分离的革兰阳性菌对多种抗

菌药物的耐药率都在 50%以上，与文献^[2]报道比较一致。葡萄球菌属和肠球菌属中尚未发现对万古霉素和替考拉宁耐药菌株。但耐甲氧西林金黄色葡萄球菌占到金黄色葡萄球菌 63%，凝固酶阴性葡萄球菌中 MRCNS 占到 76.2%，均应该引起临床医生的重视。

外科检出的肠杆菌科细菌占到革兰阴性菌的一半以上。283 株大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和奇异变形杆菌中 ESBLs 检出率为 29.7%。其中大肠埃希菌检出率为 33.5%，肺炎克雷伯菌检出率为 24.4%，奇异变形杆菌检出率为 13.3%，略低于其他研究报道^[1]。产 ESBLs 菌株对头孢菌素类抗菌药物耐药，因此肠杆菌科细菌显示出对二、三代头孢类抗菌药物较高的耐药率。这同时与临床头孢类抗菌药物的广泛应用，对产 ESBLs 菌株起到了筛选作用有很大关系。肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗菌药物(亚胺培南和美罗培南)最为敏感，对含酶抑制剂的抗菌药物(头孢哌酮/舒巴坦)耐药率也比较低。

由于目前广谱抗菌药、免疫抑制剂、肿瘤化疗药物的广泛使用以及各种侵入性操作的增多，条件致病菌导致的感染日趋严重。铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌同属于条件致病菌，其耐药机制多种多样，对目前使用的所有抗菌药物均可产生耐药，已经成为医院感染最主要的病原菌之一。本院外科检出的铜绿假单胞菌对亚胺培南、美洛培南都显示出较高的耐药性，对头孢哌酮/舒巴坦耐药率最低为 17.4%，但敏感率仅为 56.8%。对哌拉西林/他唑巴坦最为敏感，敏感率为 70.5%。不动杆菌属对多种抗菌药物的耐药率都在 50%以上，对头孢哌酮/舒巴坦的耐药率最低为 21.1%，但敏感率仅为 49.1%。对碳青霉烯类抗菌药物的敏感率在 60%左右。铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的耐药现象比较严重，临床应加强重视，及时送检标本，合理应用抗菌药物，注意手卫生的落实，加强感染医院感染监控，有效控制感染的发生同时减少医院内多重耐药菌的产生和传播。

参考文献

[1] 高昆. 外科感染常见病原菌构成及耐药情况分析[J]. 中国医师进修杂志, 2011, 34(32): 32-34.
[2] 王鹏. 二级医院外科感染常见病原菌耐药性分析[J]. 河北医药, 2010, 32(15): 2117-2118.
[3] 李爱娟, 吕火祥, 庞佩芬, 等. 外科手术感染者病原菌检测及围手术期抗菌药物使用分析[J]. 浙江医学, 2010, 32(4): 608-610.
[4] 刘岩. 外科病房 2 651 例院内感染的病原菌构成及耐药情况分析[J]. 医学信息: 上旬刊, 2010, 23(8): 2858-2860.
[5] 周有森. 外科围手术期感染的预防与治疗[J]. 医学信息, 2011, 24(9): 6142-6143.
[6] 王瑞丽, 梁建红. 2 246 株病原菌耐药情况分析[J]. 山东医药, 2011, 51(26): 105-106.

(收稿日期: 2014-10-17)

(上接第 609 页)

[8] 刘敬华, 张丽水, 刘志广, 等. 结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 突变特征初步分析[J]. 中华流行病学杂志, 2006(11): 973-976.
[9] Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(3): 719-723.
[10] 王峰, 胡思玉, 桂静, 等. PCR 熔解曲线法筛查结核分枝杆菌链霉

素和乙胺丁醇耐药性[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(5): 525-528.
[11] Fenner L, Egger M, Bodmer T, et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6): 3047-3053.

(收稿日期: 2014-10-28)