

·临床研究·

分子线性探针技术分析四川地区结核分枝杆菌耐药情况

多丽娜,王婷婷,宋兴勃,谢 轶,陆小军,范 红,应斌武,王兰兰,张 磊

四川大学华西附属医院实验医学科,四川 成都 610041

摘要:目的 应用分子线性探针 GenoType®MTBDRplus Assay(GTplus)试剂盒检测四川地区耐多药结核分枝杆菌(MTB)株的基因型特征,并初步了解耐药结核病的流行情况。方法 选取结核确诊患者105份临床标本和68株临床分离株,应用GTplus试剂盒检测MTB耐利福平和异烟肼相关的rpoB、katG、inhA基因的突变,推测其对利福平和异烟肼的耐药性。结果 151例样本的GTplus结果有效,总耐药率和耐多药率分别为29.14%(44/151)和17.22%(26/151);耐利福平和高、低水平耐异烟肼的突变菌株分别为21.85%(33/151)、21.19%(32/151)和3.31%(5/151);突变型以rpoB S531L、katG S315T1和inhA C-15T为主。痰标本组的耐多药菌株比率明显高于肺外标本组。结论 四川地区MTB耐药形势严峻,尤以耐多药结核病的情况严重,耐药菌株以rpoB S531L和katG S315T1突变型为主,应推广快速分子药敏试剂盒的临床应用,快速并提高对耐药结核病的诊断。

关键词:结核分枝杆菌;耐多药结核分枝杆菌;基因型;利福平;异烟肼

中图分类号:R378.911; R521 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2011)05-0822-03

GenoType MTBDRplus assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Sichuan

DUO Li-na, WANG Lan-lan, SONG Xing-bo, XIE Yi, LU Xiao-jun, FAN Hong, YING Bin-wu, WANG Ting-ting, ZHANG Lei

Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To explore the molecular and epidemic characteristics of rifampin (RFP) and isoniazid (INH) resistance of *mycobacterium tuberculosis* (MTB) in Sichuan. **Methods** GenoType® MTBDRplus Assay GTplus was used to examine 68 clinical isolates of MTB and 105 clinical specimens for mutations in rpoB, katG and inhA genes related to RFP and INH resistance. **Results** Of the 151 valid tests obtained, 44 (29.14%) and 26 (17.22%) showed drug resistance and multidrug resistance, respectively. Resistance to RFP and INH was found in 21.85% (33/151) and 24.50% (37/151) of the samples, respectively. The most prevalent mutations were rpoB S531L, katG S315T1 and inhA C-15T. The multidrug resistance rate in the sputum specimens was significantly higher than that in the non-respiratory samples (19.35% vs 7.41%). **Conclusion** Drug-resistant, especially multidrug-resistant tuberculosis is highly prevalent in Sichuan. The multidrug-resistant bacteria most frequently show rpoB S531L combined with katG S315T1 mutations, suggesting the necessity of developing rapid clinical identification methods for drug-resistant MTB to control the spread of the resistant strains.

Key words: tuberculosis; tuberculosis, multidrug-resistant; genotype; isoniazid; rifampin

卫生部2007~2008年全国结核病耐药基线调查显示,中国肺结核患者耐多药率为8.32%,广泛耐药率为0.68%^[1]。四川地区多年来结核疫情一直居高不下^[2]。由于普遍存在实验室诊断能力匮乏,结核耐药情况的流行病学调查的相关文献报道甚少^[2-4],因此,有必要对四川地区MTB的耐药性进行监测。基于培养的结核菌药敏试验耗时,生物危害性高,限制了其临床的应用。近年来,随着MTB耐药分子机制逐步得到确认,建立了多

种检测MTB耐药基因型而推测耐药表型的快速分子技术^[5-6]。GenoType®MTBDRplus Assay (GTplus, HAIN Life sciences GmbH, Nehren, Germany)试剂盒运用核酸反向线性探针杂交技术检测与利福平耐药密切相关的rpoB基因上一段长约81 bp的核心区域—耐利福平决定区(RRDR)以及异烟肼耐药相关的katG基因第315位密码子和inhA基因启动子区的8、15位氨基酸上的常见突变,可在6 h内完成耐多药结核分枝杆菌(MDR-TB)检测。在欧美等发达国家,该试剂盒在临床或科研中应用已得到广泛的评价^[7-8],目前已通过FDA批准可直接用于临床抗酸染色涂片阳性的病人肺部物质或阳性的纯培养细菌。2008年,世界卫生组织亦出台政策推荐使用分子线性探针技术^[9],近期开始在我国推广,本研究即为四川地区的首篇报道。本研究旨在应

收稿日期:2010-12-15

基金项目:卫生部2010-2012年度临床学科重点项目;国家自然科学基金(30871117)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30871117).

作者简介:多丽娜,硕士,E-mail: banbuer2666@sina.com

通讯作者:张 磊,博士,E-mail: zllabmed@gmail.com

用GTplus试剂盒,检测近期我院接诊的结核患者的临床标本和分离菌株中MTB耐药相关基因 rpoB、katG 及 inhA 的常见突变,推测其对利福平和异烟肼的耐药性,从而初步了解本地区结核病的耐药情况,初步探讨本地区流行的MDR-TB的基因型特征,为本地区的结核病的预防控制和临床诊疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床分离菌株 68株结核菌株来自四川大学华西附属医院 2008~2009年就诊结核患者。其中36株分离自抗酸染色涂片阳性的临床标本(包括29例痰标本和7例肺外标本),其余32株分离自涂片阴性的临床标本(包括18例痰标本和14例肺外标本)。H37Rv(ATCC27294)标准结核分枝杆菌株由四川省疾病预防控制中心结防所惠赠。

1.1.2 临床标本 收集2009年12月~2010年4月送检四川大学华西附属医院临床微生物检验室行抗酸染色涂片阳性的临床标本92例(其中89例为痰标本)及涂片阴性但结核菌荧光定量PCR检测阳性的肺外标本13例。所有标本均来自流行病学无关联的不同患者,于治疗开始前采集。105份临床标本和68株临床分离株患者平均年龄45.05(11~88)岁,男性113例,女性60例。

1.2 常规微生物学检验

临床标本的抗酸染色涂片、消化去污染及BD960

快速液体培养和改良罗氏培养基培养按规程操作^[10]。

1.3 MTB DNA 的提取及GTplus 试剂盒检测耐药基因突变

按商家推荐的方法从纯菌培养物和消化去污染后的临床标本提取核酸,于-20℃保存备用。所有操作均严格按照GTplus试剂盒的说明书进行,检测流程包括基因的耐药突变区域的PCR扩增,扩增产物的电泳初筛(2%琼脂糖凝胶电泳),扩增产物与杂交试纸上预先固定的线性排列的寡核苷酸探针在严格条件下进行杂交以及杂交探针条带的显色和结果判读。

2 结果

2.1 GTplus检测结果的有效性

共收集了173例标本,GTplus检测结果的整体有效率为87.28%(151/173)。3组标本中,临床分离菌株和涂片阳性的临床标本组的有效率达到97.06%(66/68)和88.04%(81/92),但是涂片阴性而荧光定量PCR阳性的肺外临床标本组的有效率只有30.77%(4/13)。有效结果定义为GTplus杂交试条上所有质控带以及基因的野生型和突变型探针条带均清晰显示可明确地判读结果。

2.2 GTplus 试剂盒对耐药相关基因突变点的检测结果

如表1显示,在151例有效样本中,107例未检测到与耐药相关的常见基因突变,44例被检出有基因突变而推测为耐药菌株。此外,痰标本组耐多药率明显高于肺外标本组。

表1 151例GTplus结果有效的标本中痰标本和肺外标本的耐药分布特征

标本类型	有效例数		药敏株		耐药病例数和耐药率								
					耐 RFP		耐 INH		高水平耐 INH		低水平耐 INH		耐多药
痰标本	124	87	70.16%	31	25.00%	30	24.19%	28	22.58%	2	1.61%	24	19.35%
肺外标本	27	20	74.07%	2	7.41%	7	25.93%	4	14.81%	3	11.11%	2	7.41%
合计	151	107	70.86%	33	21.85%	37	24.50%	32	21.19%	5	3.31%	26	17.22%

RFP:利福平;INH:异烟肼

2.3 耐药MTB的 rpoB、katG 和 inhA 基因突变谱的分布情况

在33例耐利福平MTB中,rpoB基因存在531位突变20(60.61%)例,其中7例单耐RFP和11例MDR-TB均为S531L突变(rpoB基因野生型WT8缺失伴突变型MUT3出现),占耐利福平MTB总数的54.55%(18/33);15.15%(5/33)为526位点突变,其中发生H526Y和H526D突变的各2例;3例样本的rpoB基因野生型WT3和WT4同时缺失,提示存在D516Y突变或515位缺失;2株发生511位点L511P突变,在国内外文献中极少有报道。此外,有3例样本的rpoB基因的野生型无缺失但同时有突变型条带的出现。

37例耐异烟肼MTB中,86.49%(32/37)为高水平耐异烟肼,katG基因存在S315T1突变,其中78.13%(25/32)为MDR-TB;另13.51%(5/37)存在inhA基因突变,80%(4/5)为低水平单耐异烟肼,inhA基因突变型均为C-15T,仅1例MDR-TB存在-8位点突变;未发现同时存在katG和inhA基因突变的样本。

3 讨论

中国耐药结核患者数占全世界的24%^[1],但我国直到最近才开始推广MTB耐药性的基因检测,目前仅限于上海、北京等少数医院和实验室各自尝试阶段^[11],而本研究是四川地区应用分子杂交技术检测结核耐药性

的首篇报道。

近期国内文献报道,成都地区近2年肺结核患者的痰标本MTB培养菌株对利福平、异烟肼的总体耐药率21.20%,19.10%至少对异烟肼耐药,17.20%至少对利福平耐药,15.10%同时对利福平、异烟肼耐药^[4]。与之相比,本研究痰标本组的总体耐药率为29.84%(37/124),利福平和异烟肼的耐药率分别为25.00%(31/124)和24.19%(30/151),总体耐多药率为19.35%(24/124),占耐药MTB的64.86%(26/37),均高于国内其他文献的报道^[4]。分析原因可能是由于本研究所纳入的标本量较少,同时本院作为西南地区疑难重症诊疗中心,收治患者中难治、复治的患者相对较多,故耐药情况的估计高于其他文献报道。

本研究及其他文献报道的结果显示,四川地区的结核总耐药率较高^[4],接近2000年全国结核病流行病学抽样调查结果27.8%^[12]。但值得注意的是,本地区结核总耐多药率(本研究为19.35%,其他文献报道为15.10%^[4])显著高于WHO最新公布的我国结核耐多药率8.3%,且高于世界上其他结核高发的大多数地区或国家^[1]。迫切需要建立并快速推广适应本地区耐药菌株特点的药敏检测方法,将有利于耐多药结核患者的早期检出,对治疗及控制耐药结核病的传播有重要意义。

本研究显示痰标本组的耐多药率明显高于肺外标本组(19.35% vs 7.41%),提示肺结核患者发生MDR-TB的几率要高于肺外结核患者,可能是由于肺结核患者诊断率高且确诊后普遍接受抗痨治疗,与之相比肺外结核病的诊断困难而仅少数患者接受了抗结核治疗。

耐药基因突变位点因国家和地区而有所差异^[13-15]。本研究结果显示本地区耐药结核菌以MDR-TB占优势,多表现为耐利福平合并高水平耐异烟肼,且突变位点较单一,最常见突变型为rpoB S531L突变伴随katG S315T1突变,而inhA基因的突变常单独发生。此外,有8株样本存在敏感菌和耐药菌的多重感染现象。由于本研究的样本量较少,对于结果显示出的突变位点单一,是否因为本地流行菌株的本身特征,亦或是本地区结核病化疗的特点所引起,还需进一步验证。

耐药性结核杆菌的基因型检测方法还需要注意一些问题。GTplus试剂盒的检测灵敏度有待进一步提高,对于含菌量较少的涂阴标本以及胸腹水、脑脊液等肺外标本多达不到检测灵敏限。环境及标本中常含有其他分支杆菌的存在,他们的一些耐药基因与MTB具有一定的同源性。目前对MTB的耐药机制尚未完全明了,基因型检测方法不能检出所有的耐药菌株。因此,“金标准”仍为传统基于培养的药敏试验,基因型检测法仅作为一种辅助方法。

总之,目前四川地区耐药结核病形式严峻,尤其耐多药结核病的情况非常严重,初步研究提示耐药相关基因的突变位点较单一,有待进一步证实。尽管存在一些问题,结核耐药的基因型分析比传统方法快速、灵敏、特异、重复性好,在临床上具有很好的应用前景,尤其对于早期危重病例的药物干预、结核杆菌的流行监测具有重要意义。

参考文献:

- [1] WHO. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response[C]. WHO/HTM/TB 2010.3. Geneva: WHO, 2010.
- [2] 陈建,杨光京,罗霖. 四川地区结核分枝杆菌耐药性和耐药谱分析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(17): 3211-2.
- [3] 罗霖,叶飞,罗涛,等. 成都市结核分枝杆菌耐药状况分析[J]. 华西医学, 2010, 10: 1854-6
- [4] 吴桂辉,周晓飞,罗涛,等. 成都地区1396例结核分支杆菌的耐药性分析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(9): 1753-4.
- [5] Ramaswamy S, Musser J. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update [J]. Tuber Lung Dis, 1998, 79(1): 3-29.
- [6] Hazbon M, Brimacombe M, Bobadilla del valle M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(8): 2640-9.
- [7] Bwanga F, Hoffner S, Haile M, et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2009, 9: 67-82.
- [8] Hillemann D, Rusch-gerdes S, Richter E. Evaluation of the GenoType MTBDRplus assay for rifampin and isoniazid susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2635-40.
- [9] WHO. Expert Group Report. Molecular Line Probe Assays for rapid screening of patients at risk of multi-drug resistance tuberculosis (MDR-TB)[C]. Geneva: WHO, 2008.
- [10] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996, 18(1): 28-31.
- [11] 桂晓虹,徐鹏,赵明,等. 耐多药结核病快速诊断试剂盒检测耐药结核分枝杆菌的评价[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(1): 43-5.
- [12] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 3-7.
- [13] Afanas'ev M, Ikryannikova L, Il'ina E, et al. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(6): 1057-64.
- [14] Minime-lingoupou F, Pierre-audigier C, Kassa-kelembho E, et al. Rapid identification of multidrug-resistant tuberculosis isolates in treatment failure or relapse patients in Bangui, Central African Republic[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(6): 782-5.
- [15] Ano H, Matsumoto T, Suetake T, et al. Relationship between the isoniazid-resistant mutation katGS315T and the prevalence of MDR-/XDR-TB in Osaka, Japan[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2008, 12(11): 1300-5.

(编辑:黄开颜)