

结核分枝杆菌耐药性快速检测的研究进展

李 惠 综述 卢贤瑜 审校

结核病的发展情况目前有增加的趋势,尤其是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)出现以后。结核分枝杆菌(MTB)的耐药性或多重耐药性显然是结核病发病率增高、病死率升高的主要原因之一。由于临床药物治疗存在化疗匹配方案不当、不规则用药及疗程不足等诸多问题,加之传统的以固体培养为主的药敏试验(如比例法),方法可靠但却费时,延误了对结核病的治疗、控制的最佳时期,使 MTB 对常规抗结核药物呈现逐年增长的耐受状态。随着实验诊断技术的发展,快速、灵敏的药敏检测法由此应运而生,本文就药敏方法的进展作一综述。

液体培养为基础的药物敏感检测方法

1. BACTEC TB 460 法 待测标本在含有¹⁴C 棕榈酸的 12B 培养基中,经一段时间培养后,分枝杆菌分解¹⁴C 棕榈酸,产生¹⁴CO₂由 BACTEC TB 460 仪自动检测到,并换算成生长指数 GI 值,通过 GI 值变化来判断分枝杆菌被相关药物抑制与否。此法快速而有效,但存在放射性污染、仪器昂贵等方面的不足。

2. 分枝杆菌生长指示法(MGIT) 其原理是在 Middle brook 7H9 肉汤中加入一种对氧敏感的荧光剂,正常时此荧光剂能被氧所淬灭。当在含有药物的肉汤中分枝杆菌生长良好时,培养管中的氧会逐步消耗,同时激发的荧光能被紫外透射仪检测到,判为对此药耐药。MGIT960 测定仪基于手工法的原理,全自动地、连续间隔 60 min 收集 1 次荧光数据。Adjers-koskela^[1]等对测定仪与手工法可靠性作过评定:MTB 对异烟肼的药敏测定与 BACTEC460 测定的符合率分别为 94%、97%;对利福平药敏测定三者结果完全一致;对于链霉素分别为 78%、72%;而对乙胺丁醇的敏感性,结果不甚理想,药物浓度需要进一步摸索评定。MGIT960 6.4 d 可获得结果,手工 MGIT 6.5 d, BACTEC460 8.7 天。

3. 荧光素酶报告噬菌体技术 将人工克隆萤

火虫荧光素酶基因与分枝杆菌噬菌体重组,这种重组噬菌体能在活的分枝杆菌中增殖,利用 ATP 而发出荧光。Banaee 等^[2]在此培养基中加入了 NAP(ρ -nitro- α -acetylaminoo- β -hydroxypropiophenone), NAP 能选择性地容许非结核分枝杆菌(NTM)生长而抑制 MTB,能快速、特异地鉴别 NTM 与 MTB,并能准确地完成对利福平、链霉素、异烟肼、乙胺丁醇的药敏测定。纯培养物接种后 2 d 可获得结果。

捕获报告噬菌体荧光检测手段有 Bronx box 法(覆盖于微孔培养板上的偏振胶片,感受到荧光而曝光,洗出而成像)和发光测量仪检测法。曾有学者^[3]用这两种方法与比例法做过对比实验,对异烟肼及利福平的耐药性完全符合,但不适于乙胺丁醇、链霉素的药敏测定(因两类药物能使 ATP 水平下降而造成假敏感性)。两法具有快速、操作简单、耗材少,培养液少等优点。

4. 硝酸盐还原比色计法^[4] 依据 MTB 具有氧化还原硝酸盐的特性,氧化还原产物亚硝酸盐被肉汤的 N-1-茶基-二胺盐酸水溶液和对氨基苯磺胺产生红色重氮染料,通过分光光度仪进行比色测定。若培养物不变色,加锌粉后变红色,表示 MTB 对待测药物敏感。以 BACTEC460 为标准,检测异烟肼和利福平敏感性分别为 100%、94%,特异性分别为 95%、100%。快速(5 d)、准确、成本低廉。但由于耐药菌株酶活性低,易造成假敏感性结果,而限于推广应用。

5. ESP 仪检测系统 此法使用压力感受器监测密封培养瓶中气体压力的变化来探测细菌生长情况。BACTEC460 被公认为吡嗪酰胺药敏试验的唯一切实可行的方法。Labombardi^[5]对 ESP、BACTEC 460 两法测定 MTB 对吡嗪酰胺的药敏性做了比较,50 例菌株 48 例结果相符。不相符的 2 例在重复试验中与 ESP 法结果前、后一致,而在 BACTEC 重复试验中前、后不一。ESP 法所需检测时间为 72 h,可靠且无放射性污染,有望取代 BACTEC 作为对吡嗪酰胺药敏测定。

作者单位:400016 重庆,重庆医科大学检验系临床免疫教研室(国家重点实验室)

通讯作者:卢贤瑜, E-mail: lxy0627@sina.com

分子生物学方法检测分枝杆菌耐药基因

当微生物耐受某种药物时,其基因可能发生了改变。研究发现在耐药的 MTb 中编码某药物作用靶蛋白的基因发生了缺失或突变,引起编码蛋白的合成障碍,使药物失去作用位点而失活,如表 1。

表 1 MTb 耐药性与基因突变相关性

药 物	基 因 突 变 型
利福平	rpoB ^[6-10, 12, 16, 17]
异烟肼	katG inhA ahpC ^[7, 9, 11, 13, 14]
链霉素	rpsL rrs ^[9]
乙胺丁醇	embB ^[9]
吡嗪酰胺	pncA ^[15]

由此,现代分子生物学实验诊断技术开发了大批快速、灵敏、准确的针对耐药基因的检测技术。

1. 单链构象多态性(SSCP)分析法 在非变性溶液的单链 DNA 会形成特殊的折叠形式,若基因位点上发生碱基突变,该分子的折叠形状、大小就会有所不同,在电泳分离时,具有不同的电泳速度。因此,敏感株与耐药株呈现不同的条带。由于 DNA 链有 2 条,每次突变就有 2 次被检出的机会,从而敏感性大大提高了。Manic^[12]等在测定利福平耐药菌株 101 例、敏感菌株 100 例中,DNA 测序、PCR-SSCP 及噬菌体增殖生物法三者灵敏度、特异性分别为 97% 与 100%、76% 与 100%、97% 与 84%。操作简单,1 天内可获得结果,成本低,只是无法确定突变位置与性质。

2. DNA 芯片 首块分枝杆菌芯片由 Troesch^[10]应用原位合成法合成。探针分两部分:其一为分枝杆菌菌种间多态性 16S rRNA 基因片段,能鉴别 MTb 与 NTM;另一部分检测耐药 rpoB 基因突变的发生情况。由于原位合成法成本较高因而难于在临幊上推广应用。此后 Gryadunov 等^[7]将含有 300bp (IS6110 loci)、212 bp (rpoB)、166 bp (katG)、143 bp (inhA) 与 126 bp (ahpC) 5 个 DNA 片段的特异性寡核苷酸探针固定于半球体胶垫上成点阵分布,通过杂交方法进行 MTb 耐药性检测。检测限 1pg, 快速(只需 12h), 对利福平、异烟肼测定的特异性与敏感性分别为 100% 与 100%, 94% 与 84%。胶垫性能好, 能均匀吸附探针, 使原有生物芯片的加工程序简化从而便于大量生产。

3. 实时聚合酶链反应(PCR) 又称荧光定量 PCR, 是一种利用荧光能量传递技术, 将 PCR、荧光光谱分析和实时检测技术结合在一起, 通过捕获荧

光信号次数来推测 PCR 产物的多少。使用的探针不同,方法略有变化。3'-小沟结合探针^[13]为长 14~15 bp 的 DNA 双螺旋结构(短探针具有不受异源性突变序列影响的优点), 5' 端接有荧光染料, 3' 端接有荧光淬灭剂, 小沟区有与靶序列互补杂交的序列。当热循环处于 DNA 变性退火阶段时, 解链的探针中部序列逐步与扩增的靶序列异源互补, 此时 5' 端荧光染料远离 3' 端淬灭剂发出强烈的荧光信号; PCR 延伸时探针从模板上解离下来, 恢复双螺旋状, 荧光染料发出的荧光被近距离的荧光淬灭剂所吸收而荧光消失。如此一来, 每个热循环都有 1 次荧光产生, 以此间接定量突变 DNA 拷贝数。野生型与突变型探针的敏感性与特异性分别为 70% 与 94%、82% 与 100%。

Edwards 等^[8]设计了 3 套 5' 端标记有荧光染料 Cy5, 3' 端标记生物素的双标记探针应用于实时 PCR 技术中来测定耐利福平 rpoB 基因的 4 个突变位点。这类探针与靶序列结合成双链时, 发出很强的荧光, 呈单链时无荧光信号。有点突变的解链温度比正常序列的低, LightCycler 仪能甄别不同解链温度下的解链峰而判断是否有突变位点。其重复性好, 准确性高(98% 的突变数据与耐药表型相符), 快速, 易操作。

4. 线性探针杂交法 此法^[16]基于反杂交原理, 根据药物作用靶基因的常见突变位点而设计不同寡核苷酸探针(R 探针)及该基因的正常序列的探针(S 探针), 将其分别固定于硝酸纤维素膜上, 与 5' 端标记有生物素的 PCR 扩增产物以平行方式杂交, 杂交后加入碱性磷酸酶显色系统, 通过显色反应判断结果。若扩增产物与 S 探针杂交, 则表示待测菌为敏感菌株; 与 R 探针杂交, 则为耐药菌株。此法快速(2h 内获得结果), 敏感性好(92.2%), 但 90 例中有 5 例耐利福平株在 rpoB305 区域无突变, 提示有试剂盒检测之外的突变位点或与其耐药机制有关的其他耐药基因存在。无独有偶, 有学者^[17]使用此法研究来源于匈牙利的利福平耐药菌, 未能测出 rpoB N 端区域有 V146F 突变的 1 例耐药菌株, 同时将 1 株具有隐形性突变的利福平敏感质控菌株误定为耐药株。由此, 扩充包揽全面的耐药基因的 R 探针势在必行, 为临幊提供全面、准确的诊断结果。

5 DNA 指纹技术 MTb DNA 序列中重复存在着 1 种相对稳定的序列——IS6110, 是 MTb 中特有成分, 具遗传稳定性。利用 IS6110 重复插入序列与 MTb DNA 的限制性长度多态性片段谱带相互杂交,

杂交后出现明显的 DNA 谱带。这种以 IS6110 重复序列探针制定出的指纹图谱用于流行病学调查研究^[9], 可追查 MTb 流行病源体的来源, 追踪药物敏感株与耐药株的传播链。

梯度双重复序列-PCR 是一种改进的快速 DNA 指纹技术^[14]。具有高特异性的梯度 PCR 法(退火温度呈梯度变化, 增加了引物与靶 DNA 退火的特异性)扩增位于基因组中双重复序列间的特定 DNA 片段, 与具有高分辨率的双重复序列 (IS6110 序列与富含 GC 序列) 探针杂交, 呈现出不同的谱带, 具流行病学意义。

液体培养法结合分子生物学检测法

来自 Takakura^[18] 的报道: 取在含不同药物的肉汤中培养 48 h 的培养物(有空白对照)离心、抽提 RNA, 再使用转录与反转录一致性反应法 (TRC, 又称等温 RNA 序列扩增实时荧光定量法) 进行扩增定量。首先, 剪切探针结合靶 mRNA 的特定位点, 通过具有 RnaseH 酶活性的禽类成髓细胞血症病毒反转录酶切去不需要的 RNA 片段, 以所需的 RNA 为模板与反义引物合成第 1 cDNA 链, , 与启动引物合成另一互补 DNA; 接下来, 在 43℃ 恒温条件下, T7RNA 聚合酶以其中 1 条有义链为模板合成新的 RNA 单链。每次循环获得的单链能与荧光探针互补, 具有双股结构的荧光探针才产生强烈的荧光, 以蛋白抗原 b 转录为标准值, TRC 对荧光产生的次数进行数字处理及拷贝数分析。当产物增多则表明对相应的药物耐药, 反之则敏感。引物设计无需考虑耐药基因, 药物筛选培养后即可同时完成对几种药物耐药性的高通量定量检测。与比例法符合率: 利福平 100%, 异烟肼 93.3%, 链霉素 80%, 乙胺丁醇 60%; 与 BACTEC MGIT960 法的符合率: 分别为 86.7%、100%、80%、53.3%。2 d 完成。

回顾与展望

液体培养法比起比例法, 结果可提前 2~3 周, 但 BACTEC 法涉及放射性核素的应用, 其他药敏测定法又有各自的应用局限性, 而分子生物学方法是最有可能满足耐药性快速检测的方法之一。随着研究的不断深入, 越来越多的报道对公认的耐药基因位点提出质疑: rpoB 基因常见突变位点报道不一^[6, 16, 17]; 南非开普顿结核高发区抽样调查中^[19], mrs 基因突变并非表现为耐链霉素。因此今后的工作需要加强对突变位点的区域性与全面性的研究,

耐药基因点突变与耐药性表型确切的相关性需要遗传学研究认定。Fortes 研究表明^[20], 用 MTb RD1 编码的 ESAT-6 代替纯蛋白衍生物做抗原以检测血清细胞因子筛选多重耐药性 (MDR) 病人与非 MDR。MDR 病人血清中 γ 干扰素显著低于非 MDR 及健康者, 而肿瘤坏死因子 α 显著性增高。提示在治疗过程当中是否引入血清学免疫方法结合培养法与分子生物学方法, 在具有流行病学意义的前提下, 能快速地将具有耐药表现型的信息准确提供给临床。

参 考 文 献

- Adjers-Koskela K, Katila ML. Susceptibility testing with the manual mycobacteria growth indicator tube (MGIT) and the MGIT 960 system provides rapid and reliable verification of multidrug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1235~1239
- Banaias N, Bobadilla-Del-Valle M, Bardarov S, et al. Luciferase reporter mycobacteriophages for detection, identification, and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3883~3888
- Hazbon MH, Guarín N, Ferro BE, et al. Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 4865~4869
- Syre H, Phyu S, Sandven P, et al. Rapid colorimetric method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin in liquid cultures. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 5173~5177
- LaBombardi VJ. Comparison of the ESP and BACTEC systems for testing susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates to pyrazinamide. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 2238~2239
- Mani C, Selvakumar N, Narayanan S, et al. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from India. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 2987~2990
- Gryadunov D, Mikhailovich V, Lapas S, et al. *J Clin Microbiol Infect*, 2005, 11: 531~539
- Edwards KJ, Metherell LA, Yates M, et al. Detection of rpoB mutations in *Mycobacterium tuberculosis* by biprobe analysis. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3350~3352
- Abbadi S, Rashed HG, Morlock GP, et al. Characterization of IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns and mechanisms of antimicrobial resistance for multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from a major reference hospital in Assiut, Egypt. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 2330~2334

10. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, et al. Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 49 ~ 55
11. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, et al. Mutations in katG, inhA, and ahpC genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 4471 ~ 4474
12. Mani C, Selvakumar N, Kumar V, et al. Comparison of DNA sequencing, PCR-SSCP and PhaB assays with indirect sensitivity testing for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7: 652 ~ 659
13. van Doorn HR, Claas EC, Templeton KE, et al. Detection of a point mutation associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by using real-time PCR technology with 3'-minor groove binder-DNA probes. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 4630 ~ 4635
14. Mokaddas E, Ahmad S, Abal AT. Molecular fingerprinting of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from chest diseases hospital in Kuwait. *Microbiol Immunol*, 2002, 46: 767 ~ 771
15. Nguyen D, Brassard P, Westley J, et al. Widespread pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* family in a low-incidence setting. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 2878 ~ 2883
16. Hirano K, Abe C, Takahashi M. Mutations in the rpoB gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 2663 ~ 2666
17. Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, et al. Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3736 ~ 3739
18. Takadura S, Tsuchiya S, Fujihara N, et al. Isothermal RNA sequence amplification method for rapid antituberculosis drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 2489 ~ 2491
19. Victor TC, van Rie A, Jordaan AM, et al. Sequence polymorphism in the rrs gene of *Mycobacterium tuberculosis* is deeply rooted within an evolutionary clade and is not associated with streptomycin resistance. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 4184 ~ 4186
20. Ferreira A, Pereira K, Antas PRZ, et al. Detection of in vitro interferon-γ and serum tumour necrosis factor-α in multidrug-resistant tuberculosis patients. *J Clin Exp Immunol*, 2005, 141: 541 ~ 548

(收稿日期:2005-09-30)

(上接第 119 页)

6. Biketov S, Mukamolova GV, Potapov V, et al. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 29: 233 ~ 240
7. Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 7210-7215
8. Wong HC, Wang P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol*, 2004, 96: 359 ~ 366
9. Rondon MR, August PR, Bettermann AD, et al. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 2541 ~ 2547
10. Ranjan R, Grover A, Kapardar RK, et al. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335: 57 ~ 65
11. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, et al. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 3023 ~ 3029
12. Rahman I, Shahamat M, Chowdhury MA, et al. Potential virulence of viable but noncultivable *Shigella dysenteriae* type 1. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62, : 115 ~ 120
13. Pruzzo C, Tarsi R, Lleo MM, et al. In vitro adhesion to human cells by viable but noncultivable *Enterococcus faecalis*. *Curr Microbiol*, 2002, 45: 105 ~ 110
14. Asakura H, Watarai M, Shirahata T, et al. Viable but noncultivable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1526 ~ 1529
15. Wong HC, Shen CT, Chang CN, et al. Biochemical and virulence characterization of viable but noncultivable cells of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Food Prot*, 2004, 67: 2430 ~ 2435
16. Colwell RR. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*, 1996, 274: 2025 ~ 2031
17. Domingue GJ Sr, Woody HB. Bacterial persistence and expression of disease. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10: 320
18. Anderson M, Bollinger D, Hagler A, et al. Viable but noncultivable bacteria are present in mouse and human urine specimens. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 753 ~ 758
19. Rudi K, Naterstad K, Dromtorp SM, et al. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*, 2005, 40: 301 ~ 306
20. Shahamat M, Alavi M, Watts JE et al. Development of two PCR-based techniques for detecting helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 3613 ~ 3619

(收稿日期:2005-09-14)