

# 一次性完成结核分枝杆菌鉴定与利福平耐药突变基因检测的新方法

孟繁荣 牛 群 雷 杰 刘炜雯 谭守勇 刘志辉

**【摘要】目的** 建立一种可同时进行结核分枝杆菌鉴定并检测结核分枝杆菌利福平耐药突变基因的分子方法。**方法** 以“TGTCTTCAGGAGAAGCG”、“TCGTCGGCGGTCAAGGTA”为上下游引物对 101 株结核分枝杆菌复合群及 52 株非结核分枝杆菌临床分离株进行 rpoB 基因扩增及序列测定，并应用 BLAST 数据库和 DNAMAN 软件进行菌种与 rpoB 基因突变分析。**结果** 在 153 例分枝杆菌临床分离株中，104 例鉴定为结核分枝杆菌复合群，49 例被鉴定为非结核分枝杆菌，与 16SrDNA 基因序列鉴定方法符合率为 96.73%，与传统分枝杆菌菌种鉴定方法符合率为 83%；在 104 例鉴定为结核分枝杆菌复合群菌株中，54 例被检测到 rpoB 基因突变，与比例法检测利福平耐药表型的符合率为 96.15%。**结论** 应用本引物进行 rpoB 基因序列分析可以一次性完成结核分枝杆菌鉴定与利福平耐药突变基因检测工作，有较大的临床应用价值。

**【关键词】** 菌种鉴定；序列分析；利福平耐药

中图分类号：R446.7；R378.91<sup>+1</sup> 文献标识码：A doi:10.3969/j.issn.1671-332X.2016.08.002

## An Innovative Method for Identifying Mycobacterium Tuberculosis and Indicating Its Rifampin Resistance Simultaneously

MENG Fanrong, NIU Qun, LEI Jie, et al

**【Abstract】Objective** To establish a new method for identification of mycobacteria tuberculosis and rpoB gene mutation of rifampicin resistance. **Methods** A pair of specific primer for amplification of the third hypervariable region and rifampicin resistance determining region in Mycobacterium genome was designed. The rpoB gene segment of 96 mycobacterium tuberculosis complex strains and 57 nontuberculosis mycobacteria was amplified and sequenced used by this specific primer and all of the gene sequences were analyzed by BLAST and DNAMAN software. **Results** Among the 153 clinical isolates, one hundred and four were identified as mycobacterium tuberculosis complex and 49 as nontuberculosis mycobacteria, including 14 mycobacterium intracellulare, 12 mycobacterium abscessus, 4 mycobacterium fortuitum, 1 mycobacterium asiaticum, 7 mycobacterium colombiense, 3 mycobacterium avium, 3 mycobacterium parascrofulaceum, 1 mycobacterium sinense, 1 mycobacterium triplex, 1 mycobacterium vulneris and 1 mycobacterium septicum / vulneris. One case could not be identified. Compared with the 16SrDNA gene, the accuracy rate of this new method was 96.73% ; Compared with the traditional method, its accuracy rate was 83%. In 104 cases identified as mycobacterium tuberculosis complex, there were 54 cases detected rpoB gene mutation which was determined resistant to RFP while 50 cases had no mutation and determined sensitive to RFP. Compared with traditional drug sensitivity test, the accurate rate of this new method was 96.15%. **Conclusion** This new method is very useful because it can be identification of common mycobacterium species and detection the rifampin resistant through rpoB gene sequence analysis by only one test.

**【Key words】** Strain Identification; Sequential Analysis; Rifampicin Resistance

**【Author's address】** Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou, 510095, China

耐多药结核病 (MDR-TB) 是结核病控制与临床诊疗中的难题。目前其诊断主要依据临床分离菌

基金项目：广东省科技计划项目(编号:2011B061300085);广东省科技计划项目(编号:2011B031800377);广州市医药卫生科技项目(编号:20151A011036);广州市科技计划项目(编号:155700012)

孟繁荣 牛 群 雷 杰 刘炜雯 谭守勇 刘志辉：广州市胸科医院 广东广州 510095

通信作者：刘志辉

株的抗结核药物敏感性结果，实验过程包括分枝杆菌分离培养、菌种鉴定和结核分枝杆菌药物敏感性试验，过程繁琐，耗时长，即便是目前较为快速先进的 MGIT960 也需 4 周左右，难以满足临床早期诊断的需求。涂片染色抗酸菌检查简便、快速，但不能鉴别分枝杆菌菌种和指示细菌耐药性，不能诊断 MDR-TB。现代分子生物学技术的发展与应用为结核

杆菌耐药性判断带来了更多选择,在方法学上可实现快速的要求。研究显示:90%以上的RPF耐药结核分枝杆菌对INH同时表现耐药,说明RPF耐药性测定是MDR-TB诊断的良好标志物<sup>[1-3]</sup>。而高达95%以上的耐RPF结核分枝杆菌的分子机制是由于编码RNA聚合酶β亚基(RNA Polymerase B,rpoB)的基因某个特定区域的突变<sup>[4-5]</sup>。亦有报道指出:不同分枝杆菌具有各自不同的rpoB基因序列,对其基因序列进行分析可将分枝杆菌鉴定至种的水平<sup>[6-8]</sup>。因此,有望通过对rpoB基因特定序列的分析一次性完成对结核分枝杆菌的鉴定和RPF耐药性检测,从而实现对MDR-TB的快速、准确诊断。本研究即是对此进行一些尝试,现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

1.1.1 标准株 来源于广州地区分枝杆菌菌种保藏库,共9株,分别为:结核H37Rv(ATCC27294)、耻垢分枝杆菌(ATCC19420)、堪萨斯分枝杆菌(ATCC12478)、胞内分枝杆菌(ATCC13950)、鸟分枝杆菌(ATCC25291)、龟分枝杆菌(ATCC35749)、不产色分枝杆菌(ATCC19530)、瘰疬分枝杆菌(ATCC19981)、爱知分枝杆菌(ATCC27280)。

1.1.2 153株分枝杆菌临床分离株均取自于我院“广州地区分枝杆菌菌种保藏库”,包括结核分枝杆菌96株、鸟胞内分枝杆菌复合群21株、龟肿分枝杆菌复合群11株、牛分枝杆菌5株、偶然分枝杆菌5株、耻垢分枝杆菌2株、次要分枝杆菌1株、戈登分枝杆菌1株、海鱼分枝杆菌1株、溃疡分枝杆菌1株、瘰疬分枝杆菌1株、玛尔摩分枝杆菌2株、嗜血分枝杆菌2株、兔分枝杆菌1株、亚洲分枝杆菌1株、猿分枝杆菌2株。

### 1.2 主要试剂仪器

通用基因组小量抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司),Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司),琼脂糖粉(Gene公司),Goldview核酸染料(鼎国昌盛生物技术有限公司),PCR扩增仪(BIO RAD公司C1000TM Thermol Cycle系列),电泳槽(BIO RAD公司PowerPac系列),凝胶成像系统(BIO RAD公司Gel DocTM XR+)

### 1.3 rpoB基因、16SrDNA基因扩增及测序

#### 1.3.1 引物设计

分枝杆菌rpoB基因扩增引物是在利用DNAMAN软件比对了已知各种分枝杆菌rpoB基因序列

的基础上,在各分枝杆菌相同的序列区设计,扩增出的目的片段应包含rpoB耐药决定区序列,如下:rpoBF-5'TGTTCTTCAGGAGAACG3';rpoBR-5'TCGTCGGCGGTCAAGGTA3',扩增片段长度为709~715bp,由英潍捷基生物技术有限公司合成;16SrDNA扩增引物直接引用自文献报道<sup>[9]</sup>,由英潍捷基生物技术有限公司合成。

#### 1.3.2 基因组DNA的提取 依照试剂盒说明书。

#### 1.3.3 基因扩增

总反应体系为50μL,包括:10×PCR缓冲液5μL,dNTP(各2.5mmol/L)4μL、上下游引物(10μmol/L)各2μL、模板3μL、Taq DNA聚合酶0.5μL和去离子水33.5μL;PCR反应条件:95℃预变性5min后,进入循环95℃变性30s,56℃(16SrDNA为53℃)退火30s,72℃延伸45s,30个循环,最后72℃延伸5min。取4μL PCR产物,经1%琼脂糖凝胶电泳和凝胶成像系统检查结果。PCR扩增产物送英潍捷基生物技术公司测序,测序引物同PCR扩增引物。

#### 1.4 数据处理

所有标本rpoB基因、16SrDNA测序结果利用美国PubMed网站“局部序列比对基本检索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)”比对分析,“Max score”“Total score”“Query cover”值最大,“E value”值为“0”,“Ident”值为100%者对应的菌种为最终鉴定结果。对鉴定为结核分枝杆菌的序列同时利用DNAMAN软件与结核分枝杆菌HRV37标准株rpoB基因序列比对。

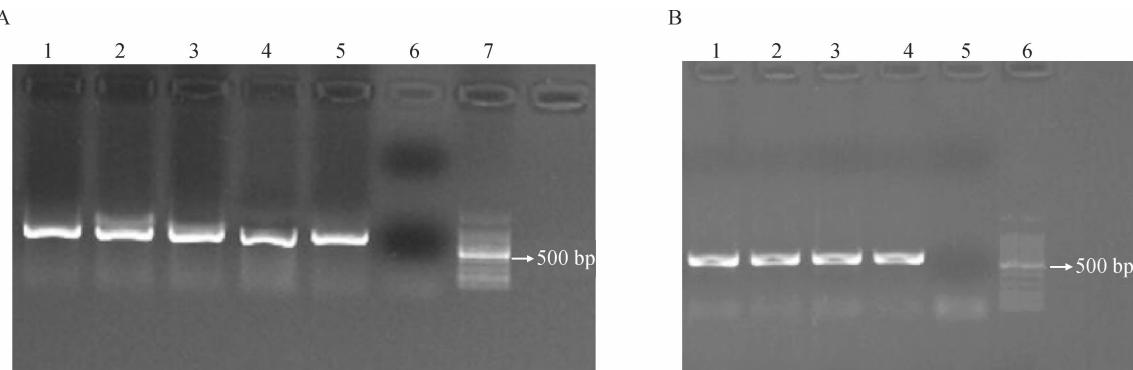
#### 1.5 统计学方法

以16SrDNA基因序列测定方法为标准,计算新方法的菌种鉴定结果与之符合率;以传统分枝杆菌菌种鉴定方法为标准,计算新方法的菌种鉴定结果与之符合率;以利福平药物敏感性比例法检测方法为标准,计算新方法对利福平药物敏感性判定结果与其符合率。

## 2 结果

### 2.1 rpoB、16SrDNA基因扩增和测序结果

153株结核分支杆菌复合群与非结核分支杆菌均成功提取基因组DNA,并扩增得到长度分别在709~715、570~580 bp的rpoB、16SrDNA基因片段,见图1。与此同时,对rpoB、16SrDNA基因扩增产物进行了DNA测序,测序图例见图2。



注:图 1-A:rpoB 基因片段,1~4 池道为 PCR 产物标本,5 池道为结核 H37Rv 标准株,6 池道为阴性对照,7 池道为 100 bp DNA Marker;图 1-B:16SrDNA 基因片段,1~3 池道为 PCR 产物标本,4 池道为结核 H37Rv 标准株,5 池道为阴性对照,6 池道为 DNA Marker

图 1 部分扩增产物电泳图谱

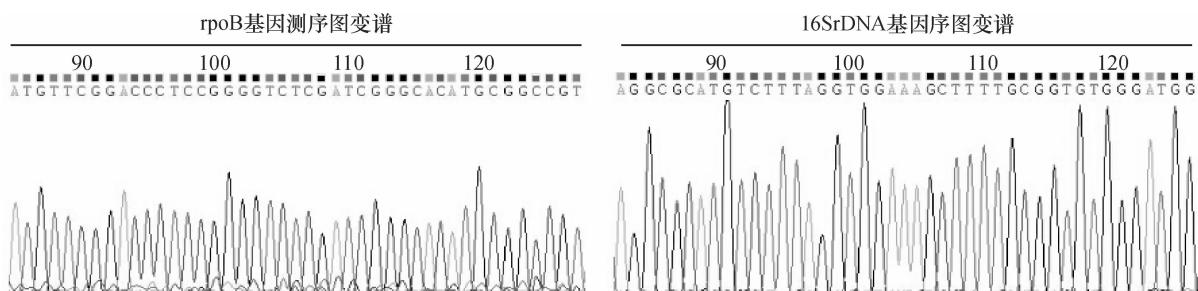


图 2 扩增产物测序结果图例

## 2.2 菌种鉴定结果

153 例分枝杆菌临床分离株中,经 rpoB 基因分析后,104 例为结核分枝杆菌复合群,14 例为胞内分枝杆菌,12 例为脓肿分枝杆菌,4 例为偶然分枝杆菌,1 例为亚洲分枝杆菌,7 例为 *Mycobacterium Colombiense* 分枝杆菌,3 例为鸟分枝杆菌,3 例为 *Parascrofulaceum* 分枝杆菌,1 例为 *Sinense* 分枝杆菌,1 例 triplex 分枝杆菌,1 例为 *Vulneris* 分枝杆菌,1 例被鉴定为 *Septicum* 或 *Vulneris*,1 例不能鉴定菌种,以 16SrDNA 基因序列鉴定方法为标准,其鉴定准确率为 96.73%;以传统分枝杆菌菌种鉴定方法为标准,其鉴定准确率为 83%。

## 2.3 利福平耐药基因突变结果

被鉴定为结核/牛分枝杆菌的 104 株菌,50 株无 rpoB 基因突变,判定为对 RFP 敏感;54 株存在 rpoB 基因突变,突变位点及例数分别为:511 位 4 例,513 位 1 例,516 位 11 例,526 位 9 例,531 位 29 例,判定为对 RFP 耐药。与比例法检测利福平耐药表型的符合率为 96.15%。

## 3 讨论

本研究通过对各分枝杆菌 rpoB 基因序列分析,设计特异引物扩增包括第 3 个高可变区序列和利福

平耐药基因决定区序列在内的 rpoB 基因片段,利用 Gene Bank BLAST、DNAMAN 软件进行序列分析而达到分枝杆菌菌种鉴定与利福平耐药性检测的目的。

研究对 153 例临床分离株中结核分枝杆菌复合群、鸟胞内复合群、龟脓肿复合群、偶然分枝杆菌、亚洲分枝杆菌、*Colombiense* 分枝杆菌、*Parascrofulaceum* 分枝杆菌、*Sinense* 分枝杆菌的鉴定结果与具有细菌系统分类“金标准”之称的 16SrDNA 基因菌种鉴定的结果一致,鉴定符合率高达 96.73%,说明本方法在分枝杆菌菌种鉴定方面具有较高准确性。然而除 1 株不能被本方法鉴定外尚有 4 株鉴定结果与 16SrDNA 基因鉴定结果不同,究其原因,可能是 Gene Bank 中保存的分枝杆菌 rpoB 基因序列种类不够全面甚至有些序列只是一些片段而导致比对中存在错漏。以传统分枝杆菌菌种鉴定方法为标准,本研究可以对结核分枝杆菌复合群、鸟胞内复合群、龟脓肿复合群、偶然分枝杆菌作出准确的鉴定,满足了对临床常见非结核分枝杆菌鉴定的要求。本研究的菌种鉴定结果与传统分枝杆菌菌种鉴定方法符合率稍低,准确率为 83%,除了 Gene Bank 本身存在的缺陷外,传统的菌种鉴定方法操作过程繁琐,影响因素多,对检验人员专业知识的高度要求及依据经验判

断也是导致其鉴定结果容易出现偏差的原因。

95% 以上的结核分枝杆菌对利福平耐药是因为 rpoB 基因 507~533 位的 81 个碱基区域的突变所导致<sup>[4~5]</sup>, 而对利福平耐药的结核分枝杆菌通常也同时对异烟肼耐药, rpoB 基因突变检测对于诊断耐多药结核病的重要性可见一斑。对本研究中被 rpoB 基因鉴定为结核/牛分枝杆菌的 104 株菌, 同时进行 rpoB 基因突变性分析, 其中 54 株被判定为对 RFP 耐药, 50 株判定为对 RFP 敏感, 与比例法检测利福平耐药表型的符合率为 96.15%, 具有非常高的准确性。新的分子生物学方法诸如利福平耐药实时荧光定量 PCR 技术(Xpert MTB/RIF)可在 2 h 内完成临床样品的结核分枝杆菌及其利福平耐药性检测, 以其较高的敏感性和特异性得到 WHO 的认可和推荐<sup>[10~13]</sup>。但其只能检测结核分枝杆菌复合群, 对目前临床日渐上升的非结核分枝杆菌无检测能力。而本研究则做到了在鉴定分枝杆菌菌种的同时完成利福平耐药基因的检测。

综上所述, 本研究方法可以准确区分结核与非结核分枝杆菌, 虽然对非结核分枝杆菌某些菌种的鉴定存在不确定性, 但对临床常见的非结核分枝杆菌菌种具有良好的鉴别, 特别是对广州市临床分离株中非结核分枝杆菌构成比在前 4 位<sup>[14]</sup>的龟脓肿分枝杆菌复合群、鸟胞内分枝杆菌复合群、偶然分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌具有良好区分, 并可同时准确检测 rpoB 基因突变判断结核分枝杆菌对利福平耐药性, 从而为 MDR-TB 的诊断提供一定参考。然而本研究中选用的分枝杆菌参考菌株数量有限, 仅 9 种, 本方法是否对现有一百多种分枝杆菌均有良好的扩增能力及鉴别能力仍值得我们做进一步验证。

同时, 鉴于痰涂片抗酸染色检查的快捷方便性, 对于没有条件完成基因扩增与序列测定的基层医疗单位, 可以考虑将痰涂片送至高级实验室进行检测。那么, 利用本研究引物直接从痰涂片标本中扩增特定 rpoB 基因片段同时完成分枝杆菌菌种鉴定与利福平耐药性检测, 将是我们进一步努力的方向。

## 参考文献

- [1] HOEK K G, GEY VAN PITTIUS N C, MOOLMAN-SMOOK H, et al. Fluorometric assay for testing rifampin susceptibility of Mycobacterium tuberculosis complex [J]. Clin Microbiol, 2008, 46(4):1369~1373.
- [2] DROBNIEWSKI F A, WATTERSON S A, WILSON S M, et al. A clinical, microbiological and economic analysis of a national service for the rapid molecular diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Med Microbiol, 2000, 49(3):271~278.
- [3] PIETZKA AT, INDRA A, STÖGER A, et al. Rapid identification of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by rpoB gene scanning using high-resolution melting curve PCR analysis [J]. Antimicrob Chemother, 2009, 63(6):1121~1127.
- [4] BARTAI 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(10):3736~3739.
- [5] CAWS M, DROBNIEWSKI F. Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance [J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 953(12):138~145.
- [6] KIM B J, LEE K H, PARK B N, et al. Differentiation of mycobacterial species by PCR-restriction analysis of DNA (342 base pairs) of the RNA polymerase gene (rpoB) [J]. Clin Microbiol, 2001, 39(6):2102~2109.
- [7] ADEKAMBI T, COLSON P, DRANCOURT M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria [J]. Clin Microbiol, 2003, 41(12):5699~5708.
- [8] DE ZWAAN R, VAN LNGEN J, VAN SOOLINGEN D. Utility of rpoB gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in the Netherlands [J]. Clin Microbiol, 2014, 52(7):2544~2551.
- [9] 彭 涛, 温博海, 蔡 锐, 等. 分支杆菌临床分离株的 16S rRNA 基因序列分析 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(9):772~776.
- [10] BOEHME C C, NICOL M P, NABETA P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study [J]. Lancet, 2011, 377(9776):1495~1505.
- [11] CRESWELL J, CODLIN A J, ANDRE E, et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(1):2~13.
- [12] HUH H J, JEONG B H, JEON K, et al. Performance evaluation of the Xpert MTB/RIF assay according to its clinical application [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14(11):589~594.
- [13] STEINGART K R, SOHN H, SCHILLER I, et al. Xpert®MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 21(1):CD009593. doi: 10.1002/14651858.
- [14] 罗春明, 邹桂敏, 刘国标, 等. 广州市 2003~2012 年非结核分枝杆菌菌种鉴定结果分析 [J]. 结核病与肺部健康杂志, 2014, 3(1):15~20.