

悬浮阵列技术在结核分枝杆菌检测中的研究进展

孙菲¹, 谢小兵², 戴佩希³, 钟巧青⁴, 盛馥¹

1. 湖南国际旅行卫生保健中心, 湖南 长沙 410100; 2. 湖南中医药大学第一附属医院;

3. 河南中医药大学; 4. 中南大学湘雅医院

摘要: 悬浮阵列技术(Luminex xMAP 技术)是一种将编码微球捕获特定检测物的抗原、抗体或核酸探针等分子的有效方法。本文综述了结核分枝杆菌检测的研究进展,探讨以结核分枝杆菌的 *Rpo B* 基因和 *CYP14I* 基因为靶标应用 Luminex xMAP 技术,构筑悬浮阵列体系,建立一种快速、灵敏、特异的方法,实现结核分枝杆菌及其耐药基因联合检测,拓展出一条更为经济、迅速、便捷的结核分枝杆菌快速检测新路径。

关键词: 悬浮阵列; 结核分枝杆菌; 耐药基因; 联合检测

中图分类号: R-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)12-1540-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2016.12.038

Research progress in using Luminex xMAP technology in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*

SUN Fei*, XIE Xiao-bing, DAI Pei-xi, ZHONG Qiao-qing, SHENG Yu

*Hunan International Travel Healthcare Center, Changsha, Hunan 410100, China

Abstract: Luminex xMAP technology is an effective method for capturing the antigen, antibody, or nucleic acid probe of the specific detection with encoding microbeads. This article reviews the research progress in the detection technology of *Mycobacterium tuberculosis* and explores the development of a Luminex xMAP system by detecting marker genes, *Rpo B* and *CYP14I* and the establishment of a fast, sensitive and specific method which can jointly detect *Mycobacterium tuberculosis* and its resistance genes, and expands a more economical and convenient new way to rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words: Luminex xMAP; *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance gene; Combined detection

结核病是由结核分枝杆菌引起的严重危害人类健康的呼吸道传染病,被列为中国重大传染病之一,一直是我国各口岸检验检疫机构实施卫生检疫的重点疾病,在出入境人员或移民体检中进行肺结核筛查也是全球结核病防控重点工作之一。世界卫生组织呼吁对出入境人员或移民进行肺结核筛查和病人分类管理,不少国家也要求我国的出境人群必须出具结核病的检测报告。

国内外用于对结核分枝杆菌的检测方法有很多,如核酸扩增实验、免疫学实验、皮肤接触测试和快速培养体系等。但能同时满足国境口岸准确和快速的检测方法还需进一步的研究和探索。

1 结核分枝杆菌目前检测方法

1.1 快速的液体培养系统 传统培养系统培养时间需要 4~10 周,而快速的液体培养系统仅需要 5~14 d 左右,价格较分子生物学检测方法便宜。目前,应用广

泛的快速液体培养系统有 BACTEC MGIT 960 system、MB/BacT system 及 BACTEC 9000MB 等,但培养时间无法满足对结核杆菌快速检测要求。

1.2 免疫学实验 目前,γ-干扰素实验相关研究较多^[1-2]。相对传统方法,其特异性较高,不受 HIV 感染和 BCG(卡介苗)的影响,但不能准确区分潜伏感染和活性肺结核^[3],且耗时长。此外,生物传感技术发展也比较迅速,检出限可达到 10 个菌体/ml,但灵敏度仍然有待提升,价格过于昂贵^[4]。

1.3 核酸扩增技术 最大优势是可以直接对标本进行检测,大大缩短了检测时间。但不同的研究,灵敏度和特异性却差异很大。目前的研究中,应用较多是 PCR 技术、DNA 芯片技术、环介导等温扩增技术(LAMP)等。

1.3.1 PCR 技术 PCR 法耗时短,不容易造成交叉污染^[5],但在大批量临床应用中发现,由于其检测结果有很多不确定因素。扩增时气溶胶污染可导致假阳性,标本中抑制物质存在可导致假阴性。

1.3.2 LAMP 技术 主要优势是操作简便,价格便宜,不需要昂贵仪器,而且特异性和灵敏度与 PCR 法近似^[6],双阳标本灵敏度为 97.7%,特异性为 99%,但对

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2015IK125);湖南省科技重点研发计划项目(2015SK2055)

作者简介: 孙菲(1969-),女,本科学历,副主任技师,主要从事微生物学与分子生物学研究工作。

于痰检阴性、培养阳性标本,灵敏度仅为 48.8%^[7]。

1.3.3 基因芯片技术 建立在 PCR 基础上的基因芯片技术,由于目标分子通过扩散与平面上的探针或抗体接触并反应的过程缓慢,影响了在芯片上结合反应的效率,此外平面阵列技术还受到成本高和需要使用昂贵仪器等的限制。

以上检测方法虽各有优缺点,但在检测时间、灵敏度和特异性三方面都很难同时兼顾,无法完全满足快速、准确检测的需要。

2 悬浮阵列技术(Luminex xMAP 技术)的应用

Luminex xMAP 技术是把直径为 5.6 μm 的聚苯乙烯小球用荧光染色的方法进行编码,通过调节两种荧光染料的不同配比获得最多可达 100 种具有不同特征荧光光谱的微球,然后将每种编码微球共价交联上针对特定检测物的抗原、抗体或核酸探针等捕获分子。其优点有。

2.1 高通量 应用时在一个反应孔内可以同时完成多达 100 种不同的检测反应,这与传统方法的逐个检测相比是质的飞跃。该技术可将结核分枝杆菌的多个靶基因作为检测靶点,同时检测结核分枝杆菌及其耐药基因。

2.2 高敏感性 该技术建立于 PCR 方法基础上,灵敏性好,可对同一细菌多个基因进行联合检测,敏感性更高于 PCR 的方法。

2.3 反应速度快 杂交反应在悬浮液相中进行,反应快速,20~40 min 可完成。

2.4 操作简便 整个过程只涉及加样和孵育,再上机读数,操作步骤较少。

2.5 重复性好 可抽取检测系统中的 100~500 颗微球进行检测并取其均值,可最大限度减少误差。

2.6 特异性高 应用碱基互补配对原则,进行液相杂交检测,特异性高。因而得到了业界的广泛认可,成为首个,也是目前唯一得到美国 FDA 许可用于临床诊断的多指标并行检测技术^[8]。悬浮阵列技术也因此被许多公司应用于新产品的开发。

2.7 应用面广 目前,国外有 20 余家公司致力于以悬浮阵列技术为平台的产品的开发,所开发产品涉及多个领域,包括基因分析领域^[9]、表达谱分析领域、免疫学分析领域^[10]。国内也已有多家公司参与相关产品的开发,如韩建博士与马旭博士联合开发的“中国人地中海贫血基因型分子诊断体系”,上海透景生命科技有限公司开发的 6 种产品:艾芯肿瘤标志物(TM,全套 9 项)、甲胎蛋白和癌胚抗原双检液芯(常规体检

2 项)、肺芯 TM(肺癌 4 项)、消芯 TM(消化肿瘤 5 项)、妇芯 TM(妇科肿瘤 5 项)和前列腺特异性抗原双检液芯(前列腺癌 2 项)。说明悬浮阵列技术已得到了广泛应用。

3 悬浮阵列技术在结核分枝杆菌检测中应用的展望

我国是全球 22 个结核病流行严重的国家之一,同时也是全球 27 个耐多药结核病流行严重的国家之一。2010 年世界卫生组织(WHO)估算中国结核病年发病人数为 100 万,占全球年发病(880 万)的 11%,位居全球第二位,2011 年,国务院办公厅印发了《全国结核病防治规划(2011-2015)》^[3],体现了政府对结核病防治工作的高度重视。

近年来,随着社会发展和国际交流不断增加,出入境人员流动也越来越频繁。2010 年,全国流动人口达 2.21 亿,2011 年达到 4.11 亿。急剧增加的流动人口,会将新的结核菌株及耐药菌株不断传入我国境内,导致一些免疫力低下的人群受到感染,给结核病的流行和控制带来负面影响;目前,国内外在结核分枝杆菌方面,尚无可推广应用的、准确的快速检测方法。究其原因,主要是检测方法的特异性和灵敏度之间的矛盾,而结核分枝杆菌生长速度慢是限制其发展的主要瓶颈。因此对出入境人员进行快速、有效的结核分枝杆菌检测和已感染人群耐药基因的动态监测,从而控制耐药菌株的出现及结核病的传播,已成为当务之急,而近几年逐渐发展起来的悬浮阵列技术(Luminex xMAP 技术)有望解决这一难题。

Chen 等^[11]应用 Luminex xMAP 技术对结核分枝杆菌和牛分枝杆菌进行鉴别诊断,取得了较好的效果。而目前结核分枝杆菌的分子学检测研究中,选用的靶基因包括 IS6110、MBP64、RpoB 和 hsp65,其中 IS6110 最为常用^[12]。IS6110 广泛存在于结核分枝杆菌的染色体基因组中,拷贝数为 8~20 个不等。但其在亚洲西南地区所鉴别出的一些菌株中缺少 IS6110 序列,如北京菌株,会造成漏诊。同时其在牛分枝杆菌(包括 BCG)中有少数量的拷贝,会引起误诊^[13]。MBP64、hsp65 基因的敏感性和特异性较差,目前研究应用的也不多。因此理想的结核分枝杆菌检测靶基因尚未出现。

CYP14I 是结核分枝杆菌细胞色素氧化酶 P450 家族的一员,是干扰氧化还原反应的代谢和呼吸中间蛋白之一,是结核分枝杆菌毒力的重要组成成分^[14],其功能目前尚未完全清楚。有研究表明^[15],*CYP14I* 基因在 BCG 菌株中不存在,但存在于所有的结核分枝

杆菌菌株中。据此,设想 *CYP14I* 基因能够区分结核分枝杆菌感染者和卡介苗接种人群。通过进一步的 NCBI-核酸比对发现该序列具有高度的特异性,并且高度保守。鉴于 *CYP14I* 基因的这些优点,*CYP14I* 基因有望成为结核分枝杆菌检测的理想靶基因。

Rpo B 基因两端为结核分枝杆菌的特异性区域,在此区域设计引物可对结核分枝杆菌进行鉴定。同时,通过分析 *Rpo B* 基因核心区域内 81 bp 的基因序列可以检测到 95% 以上的耐利福平 (RFP) 情况。针对此区域的常见突变位点设计多条检测探针可同时对其耐药情况进行检测。

综上所述,针对结核分枝杆菌的 *CYP14I* 基因和 *Rpo B* 基因,构筑悬浮阵列体系,通过关键技术攻关,建立一种快速、灵敏、特异的方法,实现结核分枝杆菌及其耐药基因联合检测,将拓展出一条更为经济、迅速、便捷的结核分枝杆菌快速检测新路径。

参考文献

- [1] Luigia EZ, Ingrid ST, Hansjakob FR, et al. Improved sensitivity of an interferon- γ release assay (T-SPOT.TB) in combination with tuberculin skin test for the diagnosis of latent tuberculosis in the presence of HIV co-infection[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11:319.
- [2] Mínguez S, Latorre I, Mateo L, et al. Interferon- γ release assays in the detection of latent tuberculosis infection in patients with inflammatory arthritis scheduled for anti-tumour necrosis factor treatment[J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(5):785-794.
- [3] Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. A systematic review of rapid diag-

nostic tests for the detection of tuberculosis infection[J]. Health Technology Assessment, 2007, 3(11):1-196.

- [4] Zhou LX, He XX, He DG, et al. Biosensing technologies for *Mycobacterium tuberculosis* detection: status and new developments[J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011:1-8.
- [5] 王雅宁. 荧光定量 PCR 技术检测结核杆菌临床应用分析[J]. 实用预防医学, 2012, 19(9):1404-1405.
- [6] 刘洋,郭艳玲,姜广路,等. 不同靶点环介导等温扩增技术对结核分枝杆菌检测的比较[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(8):843-847.
- [7] Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6):1936-1940.
- [8] 鞠少卿,王旭东,王跃国,等. 悬浮阵列技术在研究与临床中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 5(29):393-396.
- [9] Wu Y, EL Tan, Yeo A. Novel multiplex oligonucleotide-conjugated bead suspension array for rapid identification of Enterovirus 71 subgroups[J]. J Clin Microbiol, 2011, 1(49):419-422.
- [10] Garner BC, Stoker AM, Kuroki K, et al. Using animal models in osteoarthritis biomarker research[J]. J Knee Surg, 2011, 24(4):251-264.
- [11] Chen R, Bi Y, Yang G, et al. Development of a fluorescent microsphere-based multiplex assay for simultaneous rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis* in clinical samples[J]. Diagn Mol Pathol, 2010, 19(3):172-179.
- [12] 董毅,吴利先. 结核分枝杆菌基因分型技术的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2013, 40(5):336-339.
- [13] 万学勤,曾方根,唐冬生,等. 结核分枝杆菌疫源追踪的基因检测分析[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(1):43-44.
- [14] McLean KJ, Dunford AJ, Neeli R, et al. Structure, function and drug targeting in *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 systems[J]. Arc Biochem Biophys, 2007, 464(2):228-240.
- [15] Ouellet H, Johnston JB, Ortiz de Montellano PR. The *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 493(1):82-95.

收稿日期:2016-02-04

(接 1531 页)

与李耘^[2]、胡付品^[5]等的报道相似,但高于邹明祥^[7]等的报道。但阴沟肠杆菌对亚胺培南和美罗培南的耐药性均明显高于国内已有的一些报道^[2,5,7]。同样,该院常见非发酵革兰阴性杆菌(铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌)对亚胺培南和美罗培南的敏感性亦低于国内已有的一些报道^[2,5,7]。出现这种现象的原因可能与下列因素相关:不同医院的用药习惯不同,导致细菌的选择压力不同;使用的药敏检测方法不同,造成药敏结果的不一致;菌株入选的标准不同,ICU 与非 ICU 来源的菌株、门诊与住院患者来源的菌株、不同年龄组来源的菌株、不同标本来源的菌株等在监测中所占比例不同,最终导致的统计结果差异。在 2014 年度,铜绿假单胞菌对美罗培南的耐药率(42.53%)超过了对亚胺培南的耐药率(40.98%),与 2013 年度正好相反,与李耘^[2]、胡付品^[5]等的报道不一致。鲍曼不动杆菌对多种抗生素的耐药性持续保持高水平,仅有多粘菌素的敏感性超过 80%,这与国内的一些报道相似^[5-6]。本次分析的五种细菌对碳青霉烯类的耐药性都有不同程度的提高,对其他的药物如三代头孢、喹诺酮类等的敏感性有升有降,这可能与该院加强院感控制和抗生素

管理等措施有关。对一些耐药率较高的抗生素,可以暂停临床使用,启用药效相似的药物代替,并进一步监测,观察其耐药性是否有下降。

总的来说,随着多重耐药菌乃至泛耐药细菌的逐渐增多,对临床抗感染治疗提出了挑战。随着细菌耐药的发展,必须坚持进行耐药监测和分析,为临床合理使用抗生素、提高治愈率提供科学依据。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-second informational supplement[S]. M100-S22, 2012.
- [2] 李耘,吕媛,薛峰,等. 卫生部全国细菌耐药监测网(Mohnarín)2011-2012 年革兰阴性菌耐药监测报告[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(3):260-277.
- [3] 施晓群,孙景勇,倪语星,等. 2011 年中国 CHINET 铜绿假单胞菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(3):218-221.
- [4] 张辉,张小江,徐英春,等. 2011 年中国 CHINET 不动杆菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2013, 13(5):342-348.
- [5] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5):365-374.
- [6] Kuo SC, Chang SC, Wang HY, et al. Emergence of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex over 10 years: nationwide data from the Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance(TSAR) program[J]. BMC Infect Dis, 2012, 12:200-208.
- [7] 邹明祥,郭靖敏,李军,等. 湘雅医院细菌耐药性监测[J]. 实用预防医学, 2011, 18(10):1823-1826.

收稿日期:2016-05-11