

· 论 著 ·

基因芯片技术在检测痰涂阳肺结核患者结核分枝杆菌耐药性的应用效果*

陈 林, 沈 静[△], 朱大冕, 王晓英

(重庆市结核病防治所参比实验室 400050)

摘要:目的 探讨基因芯片技术在结核病耐多药快速检测中的应用效果。方法 收集重庆市五个区县 1 030 例涂阳肺结核患者的痰标本, 同时进行罗氏培养和基因芯片检测异烟肼、利福平耐药性, 培养后的菌株用比例法药敏试验检测异烟肼、利福平的耐药性。以比例法药敏试验为判断标准, 对基因芯片的检测效果进行分析。结果 对同时有两种耐药性检测结果的 958 例患者进行了统计学分析, 基因芯片对异烟肼检测结果和比例法药敏试验比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 符合率 94.1%, 灵敏度 80.2%, 特异度 95.9%, 阳性预测值 71.8%, 阴性预测值 97.4%, Kappa 值为 0.724。基因芯片对利福平检测结果和比例法药敏试验比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 符合率 96.3%, 灵敏度 86.4%, 特异度 97.5%, 阳性预测值 80.9%, 阴性预测值 98.3%, Kappa 值为 0.815。此外, 基因芯片对异烟肼和利福平耐药结核病检测结果和比例法药敏试验比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 符合率 96.9%, 灵敏度 78.3%, 特异度 98.3%, 阳性预测值 78.3%, 阴性预测值 98.3%, Kappa 值为 0.766。结论 基因芯片技术可用于耐多药结核病早期快速筛查和诊断, 以弥补传统药敏试验的不足, 但该方法对检测环境要求较高, 需对操作人员严格培训。

关键词:肺结核; 基因芯片; 异烟肼; 利福平; 比例法药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.09.007 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)09-1220-04

Evaluation of genechip in rapid detection of patients with multidrug-resistant tuberculosis*

CHEN Lin, SHEN Jing[△], ZHU Damian, WANG Xiaoying

(Reference Laboratory, Chongqing Institution of TB Prevention and Treatment, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To analyze the performance of genechip in rapid detecting multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). **Methods** The sputum samples collected from 1 030 smear positive TB patients detected in five districts of Chongqing were analyzed by genechip for detecting INH- and RFP-resistance. Simultaneously, the sputum samples were cultured with Lwenstein-Jensen culture medium followed by conventional drug susceptibility testing (DST) for detecting INH- and RFP-resistance. The conventional DST results by proportion method were served as the gold standard to evaluate the detection capability of genechip. **Results** Finally 958 patients with the results of genechip and DST were analyzed. The coincidence rate, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of genechip for INH drug resistance were 94.1%, 80.2%, 95.9%, 71.8% and 97.4%, respectively. Compared with conventional DST, the difference had no statistical significance ($P > 0.05$). And Kappa value was 0.724. The coincidence rate, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of genechip for INH drug resistance were 96.3%, 86.4%, 97.5%, 80.9% and 98.3%, respectively. Compared with conventional DST, the difference had no statistical significance ($P > 0.05$). And Kappa value was 0.815. Additionally, coincidence rate, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of NH- and RFP-resistance were 96.9%, 78.3%, 98.3%, 78.3% and 98.3%, and Kappa value was 0.766. Compared with conventional DST, the difference had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Genechip can be used for early and rapid screening and diagnosis for MDR-TB, which could cover the shortage of conventional DST, but genechip is strict with testing environment and needs strict training for the operators.

Key words: pulmonary tuberculosis; genechip; isoniazid; rifampicin; drug susceptibility testing by proportion method

随着耐多药结核病发病率的升高和广泛耐多药结核病的出现, 耐多药结核病已经成为当今全球结核病控制所面临的严峻挑战。根据 WHO 的 2015 年结核病年度报告显示^[1], 2014 年估算在全球范围内, 约有 48 万新发耐多药结核病。我国是 27 个耐多药结核病/广泛耐多药结核病高负担国家之一, 也是全球 22 个结核病高负担国家之一, 新发结核病病例仅次于印度、印度尼西亚位居全球第 3 位。目前耐多药结核病的实验室诊断常规使用传统培养和药敏试验 (DST) 检测结核分枝杆菌的耐药性, 需要 8~12 周的时间, 而液体培养和药敏试验也需

要 2~4 周的时间, 远不能满足临床治疗的需求, 因此早期快速的耐药性检测技术突破则是当前控制结核病的关键^[2]。

随着分子生物学技术的发展, 出现了快速检测耐多药结核病的分子药敏检测技术, 如 GeneXpert 检测系统、基因芯片技术、线性探针技术等。分子药敏检测技术最大的优点是快速, 是 WHO 重点推荐的结核病快速药敏检测新技术^[3]。基因芯片技术运用了多重 PCR 扩增和反向杂交, 通过检测结核分枝杆菌 rpoB 和 katG/inhA 基因的突变情况, 在 1~2 d 诊断出结核分枝杆菌对异烟肼 (INH) 和利福平 (RFP) 的耐药性, 还可同

* 基金项目: 中国卫生部与比尔及梅琳达·盖茨基金会结核病防治项目 (2009-04-01)。

作者简介: 陈林, 女, 主管技师, 主要从事结核病细菌学检查方面的研究。△ 通信作者: E-mail: 422579865@qq.com。

时进行结核分枝杆菌、非结核分枝杆菌共 17 种分枝杆菌的鉴定。本研究对 958 例涂阳肺结核患者的痰标本,以传统罗氏比例法药敏试验为判断标准,与基因芯片对 INH 和 RFP 耐药性检测作比较分析,探讨基因芯片技术在重庆市结核病耐多药诊断中的应用价值,为早期预防和治疗耐多药结核病提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 4 月 1 日至 2012 年 9 月 30 日,选取重庆市永川、大足、江津、铜梁、荣昌 5 个区县所发现的初诊涂阳肺结核患者(含初治、复治)。

1.2 标本采集 重庆市 5 个区县结核病防治机构对每例涂阳肺结核患者留取 3 份痰标本,收集的痰标本于 4~8 °C 冰箱保存,3 d 内将标本运送至重庆医科大学附属永川医院结核病实验室,每例纳入患者选取 2 份阳性级别较高的标本,同时进行传统罗氏培养和基因芯片检测,培养后的阳性菌株送至重庆市结核病防治所参比实验室进行传统比例法药敏试验。

1.3 仪器和试剂 LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪(北京博奥生物有限公司)、晶芯 Extractor™ 36 核酸快速提取仪、BioMixer™ II 芯片杂交仪、SlideWasher™ 8 芯片洗干仪、PCR 扩增仪、晶芯® 结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒、晶芯® 分枝杆菌菌种鉴定试剂盒;改良罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司)、比例法药敏试验培养基、对硝基苯甲酸(PNB)培养基、噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基。

1.4 基因芯片检测 按照晶芯® 结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒内使用说明书进行操作。

1.4.1 核酸提取 取痰标本与氢氧化钠(NaOH)-N-乙酰-L-半胱氨酸(NALC)按 1:1 比例混匀,室温静置 15 min。取 1 mL 标本处理液于 12 000 r/min 离心 5 min,去上清液,同法再离心 5 min。向核酸提取管中加入 80 μ L 核酸提取液,涡旋震荡混匀后转入核酸提取管中,将核酸提取管于超声振荡器中震荡 15 min,再放入 95 °C 以上的水浴锅里处理 5 min,取出后 12 000 r/min 离心 3 min。

1.4.2 PCR 扩增 根据标本数目,将 PCR 扩增试剂 1、2、3 分别按每管 18 μ L 分装于 200 μ L 离心管中,将其转移至 PCR 扩增区。在 PCR 扩增区加入模板 DNA,模板 DNA 包括被测样品 DNA、阳性对照品、或者阴性对照品。对于 1 个标本,向 3 管中分别加入同一模板 DNA 各 2 μ L。将离心管置于 PCR 扩增仪中,按下述程序进行 PCR 扩增反应:37 °C 600 s;94 °C 600 s;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 40 s,45 个循环;94 °C 30 s,72 °C 60 s,20 个循环;72 °C 420 s。

1.4.3 芯片杂交 PCR 扩增反应结束前,将芯片杂交仪的温度设定为 50 °C 并预热。将杂交反应混合物加热至 95 °C 变性 5 min,取出后立即浸入冰水混合物中冰浴 3 min,然后取出,用微量移液器吹吸 2 次混匀,经盖片的加样孔加入 13.5 μ L 杂交反应混合物,迅速盖上杂交盒并密封,水平放入 50 °C 预热的恒温水浴锅中,待杂交盒全部放入后计时 120 min。

1.4.4 芯片的洗涤与干燥 杂交反应结束后,将芯片取出进行芯片洗涤。按说明书配置洗涤液 I 洗涤液 II,按设置的程序进行芯片的洗涤,甩干后扫描。

1.4.5 芯片扫描和结果判读 使用 LuxScan™ 10K-B 微阵列芯片扫描仪和相应软件进行信号的读取及结果判断。

1.5 罗氏培养、比例法药敏试验和菌种鉴定 按照《结核病诊

断实验室检验规程》^[4]的方法进行操作。

1.5.1 罗氏培养 NALC-NaOH 法:痰标本经两倍于痰标本量的标本消化液(4% NaOH 10 mL、2.94% 柠檬酸三钠 10 mL、20 mg NALC)进行前处理,无菌操作接种 0.1 mL 消化液到改良罗氏培养基斜面上,放入 37 °C 恒温培养箱中,观察结果,阴性结果培养至 8 周。

1.5.2 比例法药敏试验和菌种鉴定 取临床分离分枝杆菌的新鲜菌落(初生长 2 周),研磨后与标准麦氏管(MacFarland No. 1)比浊制成 1 mg/mL 菌悬液,梯度稀释至 10⁻² 和 10⁻⁴ mg/mL,用 22SWG 接种环分别沾取一滴环(0.01 mL),接种含 INH(0.2 μ g/mL)和 RFP(40 μ g/mL)的药敏试验培养基,同时接种 TCH 和 PNB 菌种鉴定培养基,放入恒温培养箱中,37 °C 培养 4 周,观察结果。质控菌株为 MTB 标准菌株 H37RV,来自中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心国家结核病参比实验室。

1.6 质量控制 重庆市结核病防治所参比实验室和重庆医科大学附属永川医院结核病实验室人员经过国家结核病参比实验室的培训、认可,并通过基因芯片技术和传统药敏试验熟练度测试。

1.7 统计学处理 采用 SAS 9.2 统计软件进行数据整理分析,以比例法药敏试验为判断标准,计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标本检测情况 本次研究总共纳入了 1 030 例涂阳肺结核患者。在所有进行培养的 1 030 例标本中,有 34 例培养阴性(3.3%)和 6 例培养污染(0.6%),在进行 990 例传统药敏和菌种鉴定过程中,有 4 例(0.4%)菌种鉴定结果为非结核分枝杆菌,此外还有 4 例(0.4%)标本传统药敏结果失败,因此最后获得可用于分析药敏结果者 982 例。在进行芯片检测的 1 030 例标本中,分别有未检测到结核分枝杆菌 11 例(1.1%),非结核分枝杆菌 9 例(0.9%)及无法判读结果 18 例(1.8%),总计获得可用于分析基因芯片结果者 992 例。综合传统药敏结果和基因芯片结果,同时有两种检测结果的患者总计 958 例,可用于分析基因芯片对于 INH 和 RFP 耐药的检测效果。958 例患者中,男 785 例(81.94%),女 173 例(18.06%),年龄 7~88 岁,平均(44.5 \pm 3.8)岁。

2.2 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 INH 耐药性、RFP 耐药性、耐多药检测效能

2.2.1 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 INH 耐药性检测效能 对 INH 耐药检测结果显示,基因芯片技术对 INH 耐药性的检测效果与比例法药敏试验比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.96, P = 0.0851$)。检测 INH 耐药的符合率为 94.1%(901/958),灵敏度和特异度分别为 80.2%(89/111)和 95.9%(812/847),Kappa 值为 0.724,阳性预测值和阴性预测值分别为 71.8%(89/124)和 97.4%(812/834),见表 1。

2.2.2 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 RFP 耐药性检测效能 对 RFP 耐药检测结果显示,基因芯片技术对 RFP 耐药性的检测效果与比例法药敏试验比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.40, P = 0.2367$)。检测 RFP 耐药的符合率为 96.3%(923/958),灵敏度和特异度分别为 86.4%(89/103)和 97.5%(834/855),Kappa 值为 0.815,阳性预测值和阴性预测值分别为 80.9%(89/110)和 98.3%(834/848),见表 2。

表 1 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 INH 耐药性

基因芯片法	检测情况 (n)		
	比例法药敏试验		
	耐药	敏感	合计
耐药	89	35	124
敏感	22	812	834
合计	111	847	958

表 2 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 RFP 耐药性检测情况 (n)

基因芯片	比例法药敏试验		
	耐药	敏感	合计
耐药	89	21	110
敏感	14	834	848
合计	103	855	958

2.2.3 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 INH 和 RFP 同时耐药检测效能 对耐多药结核病检测结果显示,基因芯片技术对 INH 和 RFP 同时耐药结核病的检测效果与比例法药敏试验比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.00, P = 1.0000$)。检测 INH 和 RFP 同时耐药结核病的符合率为 96.9% (928/958),灵敏度和特异度分别为 78.3% (54/69) 和 98.3% (874/889), Kappa 值为 0.766, 阳性预测值和阴性预测值分别为 78.3% (54/69) 和 98.3% (874/889), 见表 3。

表 3 基因芯片技术对涂阳肺结核患者 INH 和 RFP 同时耐药检测情况 (n)

基因芯片	比例法药敏试验		
	耐药	敏感	合计
耐药	54	15	69
敏感	15	874	889
合计	69	889	958

3 讨论

近年来,随着现代结核病控制(DOTS)策略的广泛实施,我国结核病疫情得到了有效的遏制,然而结核病控制的总体形势仍然严峻,目前我国肺结核病患者的耐多药率为 8.32%,广泛耐药率为 0.68%,结核病的高耐药率已成为我国结核病控制工作中最棘手的问题^[5]。因此,及时、准确的耐药性检测方法,可以尽早发现患者,为患者的治疗提供依据,从而有效控制耐多药结核病的流行与传播。

目前结核分枝杆菌的耐药机制部分已经阐明,但仍有不少机制还不了解。耐药结核病发生的分子机制有:一些已知的与耐药相关的基因位点发生突变,产生了耐药程度的累计;细菌的细胞壁增厚,影响了药物的正常渗透;个别药物耐药与药物外排泵的过表达等有关等^[6]。伴随着结核分枝杆菌耐药分子机制的深入研究,通过检测耐药基因突变快速诊断耐药结核病的技术日益受到重视。基因芯片技术作为快速分子药敏技术,与常规培养和药敏试验相比,可极大缩短报告耐药结核病的时间,目前已经获得中国药监局 SFDA 和欧盟 CE 证书。本研究应用 DNA 芯片技术检测涂阳肺结核患者的痰标本,由于其检测的直接对象是 DNA 片段,无需接触活的结核分枝杆菌,因此其生物安全性优于传统药敏。

本次研究结果显示,与传统药敏结果比较,基因芯片技术检测 RFP 耐药性的灵敏度为 86.4%、特异度为 97.5%;检测 INH 耐药性的灵敏度为 80.2%、特异度为 95.9%。与赵冰等^[7]报道,以比例法药敏试验为判断标准,检测 RFP 耐药性的灵敏度为 84.4%、特异度为 97.7%,检测 INH 耐药性的灵敏度为 80.9%、特异度为 97.4%的研究结果比较接近。李晓非等^[8]报道,以 BACTEC MGIT 960 方法为判断标准,基因芯片检测 RFP 的敏感度为 87.8%、特异度为 96.0%,检测 INH 的敏感度为 81.9%、特异度为 91.7%;胡晓红等^[9]报道,以 DNA 测序为判断标准,基因芯片检测 RFP 耐药的敏感度为 90.1%、特异度为 93.8%;检测 INH 的敏感度为 91.2%、特异度为 94.0%,均说明在实际应用中基因芯片技术对涂阳肺结核患者痰标本结核分枝杆菌 INH 和 RFP 的耐药性检测有较高的灵敏度和特异度,本研究中 RFP 耐药性检测结果的灵敏度和特异度高于 INH。

本次研究与其他研究结果存在差异可能是由于选用的标本不同、判断标准不同、地区不同。本次研究是采用涂片阳性的肺结核患者痰标本直接检测,而其他研究有的是经培养后的阳性菌株进行检测;本研究是以比例法药敏试验为判断标准,而其他研究多采用 DNA 测序法或 BACTEC MGIT 960 方法为判断标准;另外由于地区不同,基因突变位点也存在差异,根据以往研究结果显示,不同地区结核分枝杆菌耐 RFP 和耐 INH 相关基因 rpoB、katG、inhA 和 ahpC 的突变类型和比例不同,因此其耐多药结核病快速诊断试剂盒的检测效果不同,特别是检测 INH 耐药菌株的灵敏度差别较大^[10-11]。

本研究发现基因芯片技术对 INH 耐药性检测的阳性预测值为 71.8%,对 RFP 的阳性预测值为 80.9%,据文献报道,预测值与检测方法的灵敏度和特异度以及受检人群目标疾病患病率的高低密切相关^[12]。据 2005 年重庆市结核病耐药监测结果显示,耐多药率为 4.6%,低于同一轮河南、浙江和广东耐药监测结果^[13],也低于 2010 年全国第五次结核病流行病学调查中耐多药率 6.8% 的结果^[14],说明由于多年来实施 DOTS 策略有效,重庆市结核病耐多药率低于全国平均水平、处于耐多药低流行区,因而在使用基因芯片技术时可能会出现阳性预测值偏低的情况。

本研究结果显示,与传统药敏试验相比,基因芯片技术检测 INH 耐药性的 Kappa 值为 0.724,检测 RFP 耐药性的 Kappa 值为 0.815,检测耐多药结核病的 Kappa 值为 0.766。根据 Kappa 值判定标准:0.41~0.80 为中高度,0.81~1.00 为最强高度^[12],说明基因芯片技术检测 INH 耐药性的一致性为中高度,检测 RFP 耐药性的一致性为最强高度,检测耐多药结核病的一致性为中高度。国内有研究显示,以比例法药敏试验为判断标准,基因芯片技术检测涂阳肺结核患者痰标本 INH 耐药性的 Kappa 值为 0.51~0.76,检测 RFP 耐药性的 Kappa 值为 0.82,检测耐多药结核病的 Kappa 值为 0.55~0.65^[15],与本研究结果比较接近。说明在实际应用中基因芯片技术对涂阳痰标本的结核分枝杆菌耐药性检测结果具有较高的一致性,RFP 耐药性检测结果的一致性高于 INH。

本研究发现基因芯片对 INH 的检测效果不如对 RFP 理想,检测 INH 的符合率、阳性预测值、灵敏度、Kappa 值均低于 RFP。由于基因芯片技术检测 RFP 耐药的位点为 rpoB(单个),检测 INH 耐药的位点为 katG 和 inhA,根据文献报道,在

RFP 耐药菌株中 95% 以上是由于 rpoB 基因突变所致^[16], INH 耐药主要是由于 katG 和 inhA 基因突变引起的,前者占 45%~75%,后者占 15%~25%,而在 INH 耐药的菌株中还存在着一定比例的 ahpC 和 kasA 等基因突变,也与 INH 的耐药相关^[17-18]。因此,本研究所用试剂盒可能选用的 INH 基因突变的位点不够全面,或者存在其他耐药机制。当然,基因芯片技术不能检测出所有的基因突变位点,这在一定程度上也说明基因芯片技术存在某种局限性,不能完全取代传统药敏试验,今后是否增加检测位点以提高检测灵敏度,还有待于进一步研究。

综上所述,应用基因芯片快速检出 rpoB、katG、inhA 基因突变可以作为耐多药结核病的诊断指标^[19],该技术是一种快速、安全、高效检测耐多药结核病的方法,具有较好的应用前景。但基因芯片技术对结核分枝杆菌的耐药性测定也存在着不足,对操作人员的专业技能和检测环境有着较高的要求,而且该技术检测成本较高,均会限制基因芯片技术在基层结核病实验室的推广。建议临床医师和结核病规划管理人员可将基因芯片技术作为快速诊断、治疗耐多药结核病的手段,指导临床开展早期、有效的药物治疗,并和传统药敏试验互为补充,以弥补其不足。

致谢:重庆医科大学附属永川医院结核病实验室。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015[R]. Geneva:WHO, 2015.
 [2] 胡忠义. 应重视结核病耐药性检测新技术的研究和应用[J]. 实用医学杂志, 2013, 29(23): 3801-3802.
 [3] World Health Organization. WHO report 2012: Global tuberculosis control[R]. Switzerland: WHO, 2012.
 [4] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 30-68.
 [5] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008 年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 2-5.
 [6] 唐神结, 高文. 临床结核病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 571-575.
 [7] 赵冰, 时金艳, 逢宇, 等. 基因芯片结核分枝杆菌耐多药检测在地市级实验室的应用性评估[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 718-722.
 [8] 李晓非, 梁桂亮, 普冬, 等. 基因芯片技术在分枝杆菌菌种

鉴定和结核耐药性检测中的应用及评价[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(2): 204-207.

[9] 胡晓红, 向启云, 庄倩, 等. 基因芯片法检测结核分枝杆菌耐药性的可行性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(23): 3421-3422, 3425.
 [10] Cavusoglu C, Turhan A, Akinci P, et al. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2338-2342.
 [11] Hillemann D, Rüscher-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): 2635-2640.
 [12] 李立明. 流行病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
 [13] 刘英, 刘洁, 靖宽和, 等. 重庆市结核病药物耐药监测结果分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(3): 692-694.
 [14] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[M]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 494-495.
 [15] 李卫彬, 李新旭, 张彤群, 等. 基因芯片检测技术检测结核分枝杆菌异烟肼和利福平耐药的实际应用效果评价[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(16): 4666-4670.
 [16] Pham M, Lemberg DA, Day AS. Probiotics: sorting the evidence from the Myths[J]. Med J Aust, 2008, 188(5): 304-308.
 [17] 康丽菲, 朱桂云, 李秀武, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药性研究[J]. 河北医药, 2012, 34(16): 2412-2414.
 [18] 周江, 张万江. 结核分枝杆菌对异烟肼和利福平耐药的研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2011, 13(1): 111-114.
 [19] 张俊仙, 吴雪琼, 阳幼荣. 应用基因芯片方法检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼的耐药性[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(10): 680-685.

(收稿日期: 2016-11-26 修回日期: 2017-01-08)

(上接第 1219 页)

M27-A3 [S]. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2008.
 [3] Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5): 503-535.
 [4] 魏莉. 呼吸系统疾病发生真菌感染相关因素分析[J]. 中外医学研究, 2015, 13(15): 13-14.
 [5] Pfaller M, Nofyts D, Diekema D, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance?) registry, 2004-2008[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 74(4): 323-331.

[6] Ortega M, Marco F, Soriano A, et al. Candida species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008[J]. J Hosp Infect, 2011, 77(2): 157-161.
 [7] Desalermos A, Kourkoumpetis TK, Mylonakis E. Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2012, 13(6): 783-789.
 [8] Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, et al. Guidelines for Management of Cryptococcosis[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50: 291-322.

(收稿日期: 2016-12-25 修回日期: 2017-02-19)