

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.21.011

DNA-微阵列芯片检测技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术在新疆维吾尔自治区结核分枝杆菌耐药性诊断中的应用

古丽娜·巴德尔汗¹,李远春²,阿依努尔·莫合买提¹,王乐¹,刘年强^{1△}

1. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心结核病/麻风病防治中心,新疆乌鲁木齐 830002;

2. 北京医院呼吸与危重症学科,北京 100730

摘要:目的 探索 DNA-微阵列芯片检测技术(以下简称基因芯片技术)和利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Gene-Xpert MTB/RIF 技术)检测新疆维吾尔自治区结核分枝杆菌中利福平和异烟肼耐药性的应用价值。**方法** 收集 2015 年新疆维吾尔自治区结核病耐药监测菌株 115 株,对所有的菌株进行比例法药敏试验、基因芯片技术、Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测。以比例法药敏试验为“金标准”,分别计算基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌耐药性诊断的效能并进行评价。**结果** 比例法药敏试验结果显示,利福平耐药患者 40 例(34.78%),异烟肼耐药患者 48 例(41.74%)。以比例法药敏试验结果为“金标准”,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诊断的灵敏度、特异度分别为 80.00%、89.33%和 77.08%、97.01%,Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性诊断的灵敏度、特异度分别为 92.50%、94.67%。基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术对利福平耐药患者的诊断效能差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 对于新疆维吾尔自治区结核病耐药监测菌株,基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术对耐药结核病的诊断均具有较高的灵敏度和特异度。Gene-Xpert MTB/RIF 技术操作方法简单,检测时间短;基因芯片技术耐药检测范围广,耗时少,为新疆维吾尔自治区广泛开展耐药结核病快速检测提供了有力的技术支持。

关键词:结核分枝杆菌; 耐药; 基因芯片; 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术

中图分类号:R378.91+1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)21-3113-06

Application of DNA-microarray chips and Gene-Xpert MTB/RIF in the diagnosis of drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Xinjiang Uygur Autonomous Region

GULINA · Baderhan¹, LI Yuanchun², AYINUER · Mohemaiti¹, WANG Le¹, LIU Nianqiang^{1△}

1. Tuberculosis/Leprosy Control Center of Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Disease

Control and Prevention, Urumqi, XinJiang 830002, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care, Beijing Hospital, Beijing 100730, China

Abstract: Objective To explore DNA-microarray chip detection technology (gene chip technology) and rifampicin resistance real-time fluorescent quantitative nucleic acid amplification detection technology (Gene-Xpert MTB/RIF technology) in the detection of the resistance of Mycobacterium tuberculosis to rifampicin and isoniazid in Xinjiang Uygur Autonomous Region. **Methods** The 115 tuberculosis-resistance strains were collected from Xinjiang Uygur Autonomous Region in 2015. All strains were tested for proportional drug sensitivity test, gene chip technology, Gene-Xpert MTB/RIF technology. Taking the proportional drug sensitivity test as the "gold standard", the efficacy of gene chip technology and Gene-Xpert MTB/RIF technology in the diagnosis of drug resistance of Mycobacterium tuberculosis was calculated and evaluated. **Results** The results of the proportional drug susceptibility test showed that there were 40 rifampicin-resistant patients (34.78%), 48 isoniazid-resistant patients (41.74%). Taking the results of the proportional drug sensitivity test as the "gold standard", the sensitivity, specificity of the gene chip technology for the diagnosis of rifampicin and isoniazid-resistant tuberculosis were 80.00%, 89.33% and 77.08%, 97.01%, respectively. The sensitivity and specificity of Gene-Xpert MTB/RIF technology for the diagnosis of rifampicin-resistant tuberculosis were 92.50% and 94.67%, respectively. The diagnostic efficiency of gene chip technology and Gene-Xpert MTB/RIF technology on rifampicin-resistant tuberculosis was not statistically different ($P>0.05$). **Conclusion** For the tuberculosis-resistance strains of Xinjiang Uygur Autonomous Region, gene chip technology and Gene-Xpert MTB/RIF technology have high sensitivity and specificity for the diagnosis of drug-resistant tuberculo-

sis. Gene-Xpert MTB/RIF technology has simple operation methods and short detection time; gene chip technology has a wide range of drug resistance detection and is less time-consuming, providing strong technical support for the extensive rapid detection of drug-resistant tuberculosis in the Xinjiang Uygur Autonomous Region.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; drug resistance; gene chip; Gene-Xpert MTB/RIF

结核病是造成人类死亡最多的慢性呼吸道传染病,我国是全球 22 个结核病高负担国家之一,结核病负担位居全球第 2 位^[1]。新疆维吾尔自治区是全国结核病疫情较为严重的地区,结核病感染率高,经济欠发达,加之交通不便,严重制约着对结核病的防治,另外,随着新疆维吾尔自治区耐药结核病患者的增多,结核病防治工作更为艰巨。目前,新疆维吾尔自治区结核分枝杆菌耐药性检测主要应用比例法药敏试验,但该方法对实验室操作环境及实验人员技术水平要求较高,并且获得药敏结果的时间较长,不能及时对临床进行用药指导。随着分子生物学技术的快速发展,越来越多的分子诊断技术应用于结核分枝杆菌耐药性检测,DNA-微阵列芯片检测技术(以下简称基因芯片技术)和利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Gene-Xpert MTB/RIF 技术)是其中 2 种方法,这 2 种技术较传统培养法能够在短时间内较为准确地鉴定结核分枝杆菌并检测其耐药性,可以较早、较准确地指导结核病患者的临床用药。

本研究选择 2015 年新疆维吾尔自治区耐药监测菌株,经转录间隔序列菌种鉴定后,以比例法药敏试验结果为耐药检测“金标准”,评价基因芯片技术及 Gene-Xpert MTB/RIF 技术对结核分枝杆菌菌种鉴定和耐药性诊断的效能,为后期在新疆维吾尔自治区全面开展分子诊断技术提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 选取 2015 年新疆维吾尔自治区耐药监测的 120 例疑似结核分枝杆菌感染者的临床分离株,菌株按各地区上交菌株比例随机纳入,其中喀什地区 31 株,和田地区 23 株,伊犁地区 19 株,克州地区 17 株,阿克苏地区 12 株,阿勒泰地区 10 株,乌鲁木齐市 4 株,吐鲁番和克拉玛依市各 2 株。经 16~23 S rDNA 转录间隔序列测序鉴定其中 115 株为结核病患者菌株,5 株为非结核病患者菌株,故本研究最终纳入分析的为 115 株结核分枝杆菌临床分离株。所有菌株均有异烟肼和利福平的表型药敏试验结果,基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结果也均为阳性。在 115 例结核病患者中,男 56 例(48.70%),女 59 例(51.30%);年龄 19~84 岁,平均(54.32±16.28)岁;初治 65 例(56.52%),复治 50 例(43.48%)。

1.2 罗氏固体培养基比例法药敏试验 改良罗氏培养基、利福平和异烟肼含药改良罗氏培养基均为自制。用于比例法药敏试验的利福平和异烟肼含药培养基药物终浓度分别为 40.0 μg/mL 和 0.2 μg/mL。

首先将菌悬液配制成为 1 mg/mL,再稀释成 10⁻²、10⁻⁴ mg/mL 2 个浓度,分别接种于利福平和异烟肼含药改良罗氏培养基上。所有操作均按照中国防痨协会基础专业委员会制订的《结核病诊断实验室检验规程》^[2] 进行。本试验使用的利福平和异烟肼均为美国 Sigma 公司产品(批号分别为 080M1506V 和 060M0090)。质控菌株为结核分枝杆菌标准菌株 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。

1.3 16~23 S rDNA 转录间隔序列测序 用 10.0 μL 接种环刮取罗氏固体培养基上生长的菌株约 1/2 环,水煮法提取 DNA, -20 °C 保存备用。将分枝杆菌核酸 1.0 μL,引物 1 为 1.0 μL,引物 2 为 1.0 μL, 2×MIX 12.5 μL 混合配制成 28.0 μL 的反应体系。将上述混合物于 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 63 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。测序上游引物: 5'-GAA GTC GTA ACA AGG TAG CCG; 下游引物: 5'-GAT GCT CGC AAC CAC TAT CYA^[3], 分别位于上游 16 S rDNA 的末端和 16~23 S rDNA 转录间隔序列保守区。引物的合成及扩增产物的纯化和测序均由北京擎科生物有限公司完成。

1.4 基因芯片技术检测 取出 PCR 扩增试剂,自然解冻后摇匀,分装反应体系,分别加入 2.0 μL 标本核酸溶液,按照耐药 PCR 扩增程序进行检测。进行芯片杂交及洗涤,运行结核耐药芯片杂交程序,条件 50 °C 杂交 2 h, 转速 5 r/min, 预热芯片洗干仪,待显示“请放入芯片进行洗涤”对话框,放入杂交芯片,按照提示操作,确认甩干。开始扫描,由系统判读结果。基因芯片检测系统及配套试剂均由北京博奥生物有限公司生产。

1.5 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测 首先吸取保存菌液约 1 mL 放入 15 mL 的一次性无菌离心管中,再加入前处理液 2 mL,拧紧盖子用涡旋振荡器振荡 30 s 左右后,室温静置 15 min,用无菌吸管吸取 2 mL,由加样孔缓慢加入试剂盒内,盖紧试剂盒盖后上机测试,由仪器自动判读结果。Gene-Xpert MTB/RIF 试剂盒为美国 Cepheid 公司产品。

1.6 统计学处理 采用 SPSS25.0 软件进行统计学分析,以比例法药敏试验结果为“金标准”,评价基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的效能。绘制受试者工作特征曲线(ROC 曲线),并计算灵敏度、特异度等。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率表示,组间率的比较

采用配对 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各检测方法与比例法药敏试验的一致性评价采用 Kappa 检验, $K \leq 0.40$ 时,两者一致性较差; $K > 0.40 \sim < 0.75$ 时,两者中度一致; $K \geq 0.75$ 时,两者一致性较高。

2 结 果

2.1 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对利福平的耐药性 比例法药敏试验检出利福平耐药患者 40 例 (34.78%), 基因芯片技术检出利福平耐药 40 例 (34.78%)。以比例法药敏试验结果为“金标准”, 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性诊断的灵敏度、特异度分别为 80.00%、89.33%, 阳性预测

值、阴性预测值分别为 80.00%、89.33%, 准确度为 86.87%, kappa 值为 0.693。将患者分为初治、复治 2 组分别分析, 发现基因芯片技术检测复治患者对利福平耐药性的灵敏度和阳性预测值较高。基因芯片技术与比例法药敏试验检测结核分枝杆菌对利福平耐药性具有中度一致性, 见表 1。40 例利福平耐药标本中利福平 rpoB 基因耐药位点分布为 531 (TCG → TTG) 位点 24 例 (60.0%), 526 (CAC → TAC) 位点 3 例 (7.5%), 526 (CAC → GAC) 位点 3 例 (7.5%), 511 (CTG → CCG) 位点 5 例 (12.5%), 516 (GAC → GTC) 位点 4 例 (10.0%), 513 (CAA → AAA) 位点 1 例 (2.5%)。

表 1 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的诊断效能评价

基因芯片技术	比例法药敏试验(n)			灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	Kappa 值	准确度 (%)
	耐药	敏感	合计						
全部患者				80.00	89.33	80.00	89.33	0.693	86.87
耐药	32	8	40						
敏感	8	67	75						
合计	40	75	115						
初治患者				75.00	89.58	70.59	91.49	0.633	85.93
耐药	12	5	17						
敏感	4	43	47						
合计	16	48	64						
复治患者				83.33	88.89	86.95	85.71	0.724	86.27
耐药	20	3	23						
敏感	4	24	28						
合计	24	27	51						

表 2 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对异烟肼耐药性的诊断效能评价

基因芯片技术	比例法药敏试验(n)			灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	Kappa 值	准确度 (%)
	耐药	敏感	合计						
全部患者(n)				77.08	97.01	94.87	85.53	0.761	88.70
耐药	37	2	39						
敏感	11	65	76						
合计	48	67	115						
初治患者(n)				78.95	97.78	93.75	91.67	0.804	92.18
耐药	15	1	16						
敏感	4	44	48						
合计	19	45	64						
复治患者(n)				75.86	95.45	95.65	75.00	0.690	86.00
耐药	22	1	23						
敏感	7	21	28						
合计	29	22	50						

2.2 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对异烟肼的耐药性 比例法药敏试验检出异烟肼耐药 48 例 (41.74%), 基因芯片技术检出异烟肼耐药 39 例 (33.91%)。以比例法药敏试验结果为“金标准”, 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对异烟肼耐药性诊断

的灵敏度、特异度分别为 77.08%、97.01%, 阳性预测值、阴性预测值分别为 94.87%、85.53%, 准确度为 88.70%, Kappa 值为 0.761, 基因芯片技术和比例法药敏试验检测结核分枝杆菌对异烟肼耐药性有较高的一致性, 见表 2。39 例异烟肼耐药标本中异烟肼

katG 基因耐药位点分布为 315(AGC→ACC)位点 31 例(79.5%),315(AGC→AAC)位点 5 例(12.8%);异烟肼 A 基因耐药位点分布为-15(C→T)位点 2 例(5.1%),katG 基因 315(AGC→ACC)位点联合异烟肼 A 基因-15(C→T)位点突变 1 例(2.6%)。

2.3 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平的耐药性 比例法药敏试验检出利福平耐药 40 例(34.78%),Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测利福平耐药 41 例(35.65%)例。以比例法药敏试验

结果为“金标准”,Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性诊断的灵敏度、特异度分别为 92.50%、94.67%,阳性预测值、阴性预测值分别为 90.24%、95.95%,准确度为 93.91%,kappa 值为 0.867。Gene-Xpert MTB/RIF 技术与比例法药敏试验检测结核分枝杆菌对利福平的耐药情况有较高的一致性。将患者分为初治、复治 2 组分别分析,发现 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测复治患者对利福平耐药性的灵敏度和阳性预测值较高。见表 3。

表 3 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的诊断效能评价

Gene-Xpert MTB/RIF 技术	比例法药敏试验(n)			灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	Kappa 值	准确度 (%)
	耐药	敏感	合计						
全部患者				92.50	94.67	90.24	95.95	0.867	93.91
耐药	37	4	41						
敏感	3	71	74						
合计	40	75	115						
初治患者				87.50	95.83	87.50	95.83	0.833	93.75
耐药	14	2	16						
敏感	2	46	48						
合计	16	48	64						
复治患者				95.65	92.59	91.67	96.15	0.882	94.12
耐药	23	2	25						
敏感	1	25	26						
合计	24	27	51						

2.4 基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的诊断效能评价 115 例基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检验结果均为阳性的患者中,基因芯片技术检出利福平耐药 40 例(34.78%),Gene-Xpert MTB/RIF 技术检出利福平耐药 41 例(35.65%)例。基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术对利福平耐药患者的诊断效能比较见图 1。检验结果显示,2 种分子生物学检测方法对利福平耐药患者的诊断效能差异无统计学意义($P>0.05$)。

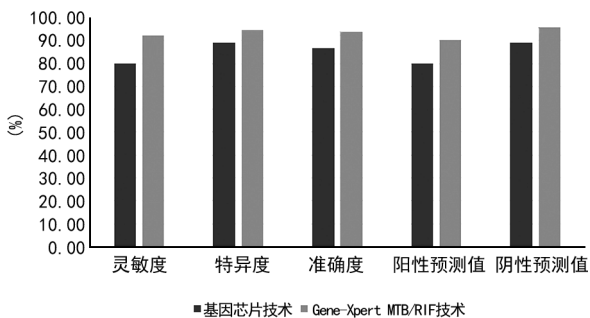


图 1 基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的诊断效能比较

2.5 ROC 曲线分析 以比例法药敏试验结果为参照标准,绘制基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的 ROC 曲

线。基因芯片技术 ROC 曲线下面积为 0.850 ± 0.040 ,Gene-Xpert MTB/RIF 技术 ROC 曲线下面积为 0.936 ± 0.020 ,Gene-Xpert MTB/RIF 技术 ROC 曲线下面积大于基因芯片技术,2 种方法曲线下面积差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

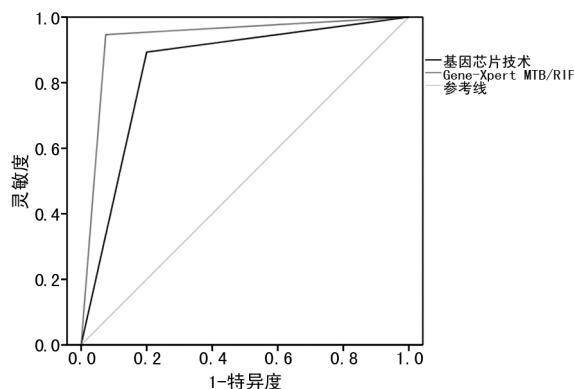


图 2 基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的 ROC 曲线

3 讨 论

我国是全球 27 个耐多药结核病高负担国家之一。利福平与异烟肼作为最重要的一线抗结核药物组合,快速检测结核分枝杆菌对利福平与异烟肼的灵敏度对指导临床治疗用药具有重要意义。近年来,随着分子生物学理论与技术的不断发展,一些分子生物学诊断技术也逐渐用于临床结核病的诊断和指导治

疗。Gene-Xpert MTB/RIF 技术和基因芯片技术均为 WHO 批准并推荐用于肺结核诊治的分子生物学诊断技术^[4]。

基因芯片技术通过检测标本中结核分枝杆菌的 *rpoB*、*katG* 和异烟肼 A 基因的突变情况,判定其对利福平和异烟肼的耐药性,具有快速、简便、高通量等特点,一次能够同时检测十几至几十个基因位点,适用于多位点分析,其灵敏度、特异度及准确度已得到临床广泛认可^[5-7]。本研究中,基因芯片技术对利福平耐药检测的灵敏度为 80.00%,特异度为 89.33%,准确度为 86.87%,对异烟肼耐药检测的灵敏度为 77.08%,特异度为 97.01%,准确度为 88.70%,具有较高灵敏度及准确度,其结果与比例法药敏试验具有中度一致性,与目前报道的研究结果基本一致^[8-9]。

Gene-Xpert MTB/RIF 技术是集标本处理、DNA 提取、核酸扩增、结核分枝杆菌特异核酸检测、利福平耐药基因 *rpoB* 突变检测于一体的结核病和耐药结核病快速诊断方法,是 WHO 推荐的结核分子生物学检测技术之一,全过程只需约 2 h,耗时短,操作简单,无生物安全需求^[5]。本研究中,Gene-Xpert MTB/RIF 技术对利福平耐药检测的灵敏度、特异度分别为 92.50%、94.67%。以往研究表明,Gene-Xpert MTB/RIF 技术诊断利福平耐药的灵敏度为 92.9%~98.2%,特异度为 95.5%~98.7%^[6-7],与本研究结果基本一致。

利福平发挥抑菌和杀菌作用的机制为作用于结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的 β 亚单位,干扰转录的开始及 RNA 的延伸。95.0% 对利福平耐药菌株的突变发生在 *rpoB* 基因 81 bp 的热点区域(编码密码子为 507~533 位),该区域被称为利福平耐药决定区,85.0% 耐药菌株出现 531 位 Ser、526 位 His 和 516 位 Asp 基因变异^[10]。本研究采用结核分枝杆菌耐药试剂盒检测 *rpoB* 基因利福平耐药决定区的 531、526、511、516、513 位密码子,结果显示,新疆维吾尔自治区 531 突变位点为优势突变位点,其中 531 位点占 60.0%,526 位点占 7.5%,与相关研究结果相似^[11-12]。

异烟肼主要作用于细胞壁中的分枝菌酸、DNA、脂类等成分。在耐异烟肼的结核分枝杆菌分离株中有 50%~90% 的 *katG* 基因发生突变,另一个与耐药性密切相关的基因为异烟肼 A 基因,该基因突变致结核分枝杆菌异烟肼耐药比例为 3%~30%^[13]。本研究采用结核分枝杆菌耐药试剂盒检测 *katG* 基因的 315 位密码子和异烟肼 A 基因的-15 位密码子,结果显示,新疆维吾尔自治区 *katG* 基因突变占主导地位(92.3%),占绝对优势,异烟肼 A 基因突变占次要地位(5.1%)。*katG* 基因 315 位点为绝对优势突变位点(92.3%),与相关研究结果不一致^[12-14],可能的原因为本研究是以比例法药敏试验为“金标准”,而其他研究多采用 Bactec MGIT960 液体培养法或 DNA 测序

为判断标准,除此之外,基因突变位点也存在地域性差异,以往研究结果显示,不同地区结核分枝杆菌耐异烟肼相关基因的突变类型和比例不同,因此,其耐药结核快速诊断试剂盒的检测结果不同^[10]。

本研究中,基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药检测的灵敏度和特异度均高于异烟肼。基因芯片技术、Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测利福平耐药的工作原理均为测定结核分枝杆菌的 *rpoB* 基因突变。有文献报道,利福平耐药结核分枝杆菌的 *rpoB* 基因突变率为 95.0%^[15],异烟肼耐药的结核分枝杆菌分离株其 *katG* 和异烟肼 A 基因操纵子的突变比例只占 80.0%,小于 *rpoB* 基因在利福平耐药中的比例;*KatG* 与异烟肼 A 基因中除本研究选择的 315 及-15 位点外,极少数其他位点突变也可能引起异烟肼耐药^[16]。此外,陆续发现新的异烟肼耐药相关基因,如 *ahpC*,但基因芯片技术并不能检测该耐药相关基因的突变情况。故基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测方法对利福平耐药的检测效能稍高于对异烟肼的检测效能。Gene-Xpert MTB/RIF 技术检测利福平耐药诊断效能稍高于基因芯片技术(ROC 曲线下面积 0.936 vs. 0.850),可能的原因为 Gene-Xpert MTB/RIF 技术是一体化操作,包括痰标本处理、DNA 提取、核酸扩增、结核分枝杆菌特异核酸检测、利福平耐药基因 *rpoB* 突变检测等,与手工处理相比标准化程度更高。

新疆维吾尔自治区经济欠发达,农村地区生存条件严苛,结核病是主要的传染病之一。据 2000 年全国第四次结核病流行病学抽样调查结果显示,新疆维吾尔自治区结核病患病率、涂阳患病率和死亡率分别是 464/10 万和 160/10 万和 38/10 万,分别是全国平均水平的 1.26、1.51 和 3.88 倍。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示,新疆维吾尔自治区 15 岁以上人群活动性肺结核患病率达 1 576/10 万,南疆喀什地区高达 2 727/10 万,其中农牧民患者占 72.5%,农村居民患病率是城市的 3 倍^[16]。新疆维吾尔自治区结核病患者发病率高,农村人口多于城市人口,分布较广,迫切需要结核耐药快速诊断方法以指导患者的治疗。

常规使用传统培养和药敏试验检测结核分枝杆菌的耐药性,通常需要 8~12 周的时间, Bactec MGIT960 液体培养和药敏试验也需要 2~4 周的时间。基因芯片技术和 Gene-Xpert MTB/RIF 技术运用多重 PCR 扩增和反向杂交原理,通过检测结核分枝杆菌相关耐药基因的突变情况,可在 2~4 h 内诊断出结核分枝杆菌对利福平和异烟肼的耐药性^[17]。Gene-Xpert MTB/RIF 技术操作简单,检测一体化程度高,对检测人员要求较低,适合在新疆维吾尔自治区广泛推广。基因芯片技术与 Gene-Xpert MTB/RIF

RIF 技术相比,检测的耐药范围更广。这 2 种分子生物学技术缩短了获取一线抗结核药物药敏结果的时间,对指导患者尤其是新疆维吾尔自治区耐多药患者的治疗有重大意义。

本研究中也有一些不足:由于成本问题,本研究入选标本数量相对不足,在耐药性评价中存在一定局限性;2 种分子生物学技术所检测耐药基因位点有所不同,基因芯片技术覆盖面相对较广且清晰,而 Gene-Xpert MTB/RIF 技术仅能定性检测是否为利福平耐药,无法对基因芯片相关的基因突变型进行验证;本研究未评价 3 种耐药检测方法的效益与成本。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015[R]. Geneva: World Health Organization, 2015.
- [2] 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.
- [3] LIKUAN X, FANRONG K, YINGZHOU Y, et al. Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 Mycobacterium species[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10): 3544-3550.
- [4] World Health Organization. WHO endorses new rapid tuberculosis test[R]. Geneva: World Health Organization, 2010.
- [5] 刘荣梅, 高孟秋, 吴晓光, 等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术与 γ -干扰素释放试验在关节结核辅助诊断中的价值[J]. 中国医刊, 2016, 51(6): 70-72.
- [6] TABRIZ N S, SKAK K, KASSAYEVA L T, et al. Efficacy of the Xpert MTB/RIF assay in multidrug-resistant Tuberculosis[J]. Microb Drug Resist, 2020, 268(8): 997-1004.
- [7] DESHMUKH S, ATRE S, CHAVAN A, et al. Assessment of the Xpert assay among adult pulmonary tuberculosis suspects with and without diabetes mellitus[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2020, 24(1): 113-117.

- [8] 吴国兰, 陈晓红, 陈力舟, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌耐药位点对耐药结核的早期诊断价值[J]. 中国医刊, 2018, 53(7): 812-814.
- [9] 杨建林, 罗一钧. DNA 微阵列芯片法快速检测结核分枝杆菌 KatG、异烟肼 A 和 rpoB 基因突变及其与利福平、异烟肼耐药的关系研究[J]. 临床合理用药杂志, 2017, 10(33): 145-146.
- [10] ASLAN G, TEZCAN S, EMEKDAS G. Evaluation of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates[J]. Mikrobiyol Bul, 2009, 43(2): 217-226.
- [11] 韦红玉, 隆昕颖, 凌俊, 等. 广西百色地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药基因特征[J]. 实用医学杂志, 2015, 44(7): 731-734.
- [12] 高会霞, 冯爱东, 柳晓金, 等. 基因芯片技术诊断耐多药结核病的临床应用研究[J]. 天津医药, 2016, 44(9): 1155-1159.
- [13] 张文海. 扬州市结核分枝杆菌分子分型及耐药性监测[D]. 扬州: 扬州大学, 2016.
- [14] DOMÍNGUEZ J, BOETTGER E C, CIRILLO D, et al. Clinical implications of molecular drug resistance testing for Mycobacterium tuberculosis: a TBNET/RESIST-TB consensus statement[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(1): 24-42.
- [15] 欧维正, 骆科文, 陈峥宏, 等. 贵州地区结核分枝杆菌利福平耐药相关基因 rpoB 突变特征分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(10): 833-835.
- [16] 杨津明, 杰恩斯·斯马胡勒, 邵新蓉, 等. 新疆维吾尔自治区 2010—2011 年结核病流行病学抽样调查结果分析[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(12): 960-964.
- [17] HSIANG E, LITTLE K M, HAGUMA P, et al. Higher cost of implementing Xpert® MTB/RIF in ugandan peripheral settings: implications for cost-effectiveness[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(9): 1212-1218.

(收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-07-13)

(上接第 3112 页)

- [7] CASTERA L, FORNS X, ALBERTI A. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using transient elastography[J]. J Hepatol, 2008, 48(5): 835-847.
- [8] BRAVO A A, SHETH S G, CHOPRA S. Liver biopsy[J]. N Engl J Med, 2001, 344(7): 495-500.
- [9] TAPPER E B, LOK A S F. Use of liver imaging and biopsy in clinical practice[J]. N Engl J Med, 2017, 377(23): 2296-2297.
- [10] LI Q, LI W, LU C, et al. Serum hepatitis B surface antigen levels predict insignificant fibrosis and non-cirrhosis in hepatitis B e antigen positive patients with normal or mildly elevated alanine transaminase levels[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 86463-86470.
- [11] MARTINOT-PEIGNOUX M, CARVALHO-FILHO R,

LAPALUS M, et al. Hepatitis B surface antigen serum level is associated with fibrosis severity in treatment-naive, e antigen-positive patients[J]. J Hepatol, 2013, 58(6): 1089-1095.

- [12] 窦晓光. 丙氨酸转氨酶正常的慢性乙型肝炎病毒感染人群抗病毒治疗策略[J]. 中国实用内科杂志, 2013, 33(6): 454-456.
- [13] 杨湛, 何凯茵. 血清 A/G 及 ALT/AST 比值、门静脉直径和脾厚径与肝纤维化程度的关系[J]. 广东医学, 2001, 22(6): 494-495.
- [14] 耿晓霞, 林健梅, 杨兴祥, 等. 肝脏瞬时弹性超声诊断 ALT 小于 2 倍正常上限慢性 HBV 感染者肝纤维化的影响因素分析[J]. 实用医院临床杂志, 2015, 12(2): 34-36.

(收稿日期: 2020-02-26 修回日期: 2020-06-19)