

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.18.007

不同检测方法在结核病利福平耐药快速诊断中的临床应用研究^{*}

包训迪,王庆[△],王舒,徐东芳,梁锁,江跃

安徽省胸科医院/安徽省结核病防治研究所检验科,安徽合肥 230022

摘要:目的 评价结核病实验室不同检测方法在结核病患者利福平(RFP)耐药快速诊断中的检测效能及应用价值。方法 收集 2020 年 1—7 月在该院就诊的肺结核患者痰或肺泡灌洗液标本,采用不同检测方法进行结核分枝杆菌及 RFP 耐药快速检测,评价不同检测方法在结核分枝杆菌和 RFP 耐药快速诊断中的检测效能。结果 多色熔解曲线分析(MMCA)法、Gene-Xpert 法、微孔板(MIC)法检测均获得 RFP 药敏试验结果的有 77 例,77 例中 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率(38.96%、33.77%、35.06%)比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);不同性别、年龄、菌量标本的患者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 MMCA 法、Gene-Xpert 法和 MIC 法在临床上检测结核分枝杆菌对 RFP 的耐药性结果无明显差异,均具有较高的灵敏度和特异度,可结合临床实际需求选择药敏药检测技术。

关键词:多色熔解曲线分析; Gene-Xpert; 微孔板; 肺结核; 利福平; 耐药

中图分类号:R52

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)18-2651-04

Study on the clinical application of different detection methods in the rapid diagnosis of tuberculosis resistance to rifampicin^{*}

BAO Xundi, WANG Qing[△], WANG Shu, XU Dongfang, LIANG Suo, JIANG Yue

Department of Clinical Laboratory, Anhui Chest Hospital/Anhui Provincial Institute of Tuberculosis Prevention and Control, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: **Objective** To evaluate the efficacy and application value of different tuberculosis laboratory testing methods in the rapid diagnosis of rifampicin (RFP) resistance in tuberculosis patients. **Methods** Sputum or alveolar lavage fluid samples from pulmonary tuberculosis patients treated in the hospital from January to July 2020 were collected. Different detection methods were used for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and RFP resistance, and the detection efficiency of different detection methods in rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and RFP resistance was evaluated. **Results** The results of RFP susceptibility test were obtained by multicolor melting curve analysis (MMCA), Gene-Xpert and microplate (MIC) in 77 cases. There was no significant difference in the drug resistance rate of Mycobacterium tuberculosis to RFP (38.96%, 33.77% and 35.06%) among the three detection methods ($P>0.05$). There was no significant difference in the drug resistance rate of Mycobacterium tuberculosis to RFP among patients with different gender, age and bacterial samples ($P>0.05$). **Conclusion** MMCA method, Gene-Xpert method and MIC method have no significant difference in the clinical detection of drug resistance of Mycobacterium tuberculosis to RFP. They all have high sensitivity and specificity. The drug sensitivity detection technology can be selected according to the actual clinical needs.

Key words: multicolor melting curve analysis; Gene-Xpert; microplate; tuberculosis; rifampicin; drug resistance

结核病是一种全球感染人数最多,经呼吸系统传播的疾病,已成为全球十大死亡原因之一。近年来,随着耐药结核病的日益增多,结核病的疫情防控工作从各方面都面临着巨大挑战^[1-2]。根据我国第 5 次结核病流行病学抽样调查和第 1 次耐药结核病基线调

查数据^[3-4],我国每年大约新发结核病患者约 93 万人,估算耐多药结核病患者约 5.2 万人^[5]。有研究指出,耐利福平(RFP)患者大部分为耐多药结核病患者,因此,世界卫生组织(WHO)在耐多药结核病患者中发现,近期耐 RFP 患者即可按照耐多药结核病患

^{*} 基金项目:安徽省卫生和计划生育委员会科研计划项目(15tb011);安徽省胸科医院科研项目(2020kj018B)。

作者简介:包训迪,男,副主任技师,主要从事结核病诊断方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: ahtbcbs@126.com。

本文引用格式:包训迪,王庆,王舒,等. 不同检测方法在结核病利福平耐药快速诊断中的临床应用研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18 (18): 2651-2654.

者进行治疗。耐药结核病的诊断主要依赖于结核分枝杆菌药物敏感(简称药敏)试验,传统的细菌学药敏试验是目前诊断耐药结核病的“金标准”,但传统药敏试验时间长,影响耐药结核病的防控、及时诊断和治疗工作。因此,结核病和耐药结核病的早期快速诊断对结核病疫情控制起着至关重要的作用。

进入 21 世纪,随着分子生物学检测技术的飞速发展,结核分枝杆菌和 RFP 耐药基因的快速检测均有成熟易用的技术在推广使用。多色熔解曲线分析(MMCA)法为我国自主研发技术,可同时进行结核分枝杆菌和多种抗结核药物的快速检测^[6-7]; Gene-Xpert 法为 WHO 推广使用的快速检测技术,同样可同时进行结核分枝杆菌和 RFP 耐药基因的检测。这两种方法均为 DNA 扩增检测技术,具有操作相对简单、灵敏度高、特异度高等特点^[8-9]。微孔板(MIC)法是近几年报道的一种细菌学药敏检测方法,利用 MIC 中加入抗结核药物进行药敏检测,可缩短耐药检测时间^[10]。本研究采用这 3 种检测方法对肺结核患者进行结核分枝杆菌和 RFP 耐药的快速诊断,以评估这 3 种检测方法在结核分枝杆菌和 RFP 耐药快速诊断中的检测效能,进一步分析其在结核病和耐药结核病控制中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2020 年 1—7 月在本院就诊的 300 例肺结核患者作为研究对象。300 例患者中男 214 例,平均年龄(49.72±19.12)岁;女 86 例,平均年龄(43.77±20.06)岁。

1.2 仪器与试剂 Gene-Xpert 法检测仪器 GeneXpert 及配套试剂盒购自美国 Cepheid 公司,MMCA 法结核分枝杆菌耐药突变检测仪器 SLAN-96S 及配套试剂盒购自厦门致善生物科技有限公司,MIC 法结核药敏检测仪器 YK960 及配套试剂盒购自珠海市银科医学工程股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 采集肺结核患者的痰或肺泡灌洗液标本,按照结核病实验室标准操作流程采用 MMCA 法、Gene-Xpert 法检测 RFP 耐药性,同时进行结核分枝杆菌培养,培养阳性菌株再进行 MIC 法检测 RFP 耐药性。

1.3.2 结核分枝杆菌和 RFP 耐药检测方法 (1)MMCA 法:取标本 1~2 mL,加入 1~2 倍标本前处理液处理,以 12 000×g 离心 15 min,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬后洗涤,12 000×g 离心 5 min,弃上清液,加入核酸提取液,上核酸提取仪进行核酸提取,提取后的 DNA 按照试剂盒说明书进行检测,由仪器根据核酸解链温度自动判读结果。(2)Gene-Xpert 法:取待检标本 2 mL,加入 1~2 倍标本前处理液处理,消化处理 15 min 后,按照试剂盒操作说明书进行操作,由仪器自动判读结果,结核分枝杆菌半定量检测结果分为阴性、极低、低、中、高 5 个菌量级别,RFP 耐药检

测结果分为耐药、敏感。(3)MIC 法检测:取患者 1~2 周内培养阳性菌株,根据操作说明书,将菌株进行比浊定量,加入 MIC 相应药敏检测位置,37℃培养 10~14 d 后,由仪器判读药敏试验结果。

1.4 统计学处理 将数据录入 EXCEL2016,使用 SPSS19.0 软件对数据进行统计分析、处理。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料以频数、率表示,组间比较采用 χ^2 检验,如理论数 $T \geq 5$ 且总样本量 $n \geq 40$,组间比较采用 χ^2 检验;如理论数 $T < 5$ 但 $T \geq 1$,且 $n \geq 40$,组间比较采用连续性校正的 χ^2 检验;如理论数 $T < 1$ 或 $n < 40$,组间比较则用 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种检测方法结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果 采用 MMCA 法、Gene-Xpert 法、MIC 法对 300 例肺结核患者标本进行检测,MMCA 法获得 132 例药敏试验结果,Gene-Xpert 法获得 192 例药敏试验结果,MIC 法获得 201 例药敏试验结果。3 种检测方法均获得结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果的患者有 77 例,其中有 63 例继发性肺结核、12 例空洞型肺结核、2 例浸润性肺结核;40 例为复治结核病患者。3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 3 种检测方法结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果				
检测方法	<i>n</i>	RFP 耐药(<i>n</i>)	RFP 敏感(<i>n</i>)	耐药率(%)
MMCA 法	77	30	47	38.96
Gene-Xpert 法	77	26	51	33.77
MIC 法	77	27	50	35.06
χ^2				0.489
<i>P</i>				0.783

2.2 不同性别患者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药情况比较 3 种检测方法均获得结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果的 77 例患者中,男 53 例,女 24 例。不同性别患者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 不同性别患者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药情况比较[<i>n</i> (%)]				
性别	<i>n</i>	MMCA 法	Gene-Xpert 法	MIC 法
男	53	21(39.62)	17(32.08)	18(33.96)
女	24	9(37.50)	9(37.50)	9(37.50)
χ^2		0.031	0.217	0.091
<i>P</i>		0.860	0.641	0.763

2.3 不同年龄组患者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药情况比较 将 3 种检测方法均获得结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果的 77 例患者分为 ≤ 25 岁、 $>25 \sim 50$ 岁、 >50 岁 3 个年龄组。不同年龄组患

者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 不同年龄组患者 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药情况比较[n(%)]

组别	n	MMCA 法	Gene-Xpert 法	MIC 法
≤25 岁组	15	5(33.33)	5(33.33)	5(33.33)
>25~50 岁组	24	10(41.67)	8(33.33)	8(33.33)
>50 岁组	38	15(39.47)	13(34.21)	14(36.84)
χ^2		0.278	0.027	0.104
P		0.870	0.987	0.949

2.4 不同菌量标本 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药情况比较 将 3 种检测方法均获得结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果的 77 例患者标本按照菌量分为高、中、低、极低菌量 4 个级别,不同菌量标本 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 4。

表 4 不同菌量 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药情况比较[n(%)]

菌量级别	n	MMCA 法	Gene-Xpert 法	MIC 法
高菌量	10	5(50.00)	4(40.00)	4(40.00)
中菌量	39	13(33.33)	11(28.21)	12(30.77)
低菌量	19	8(42.11)	8(42.11)	8(42.11)
极低菌量	9	4(44.44)	3(33.33)	3(33.33)
χ^2		0.740	1.305	0.848
P		0.864	0.728	0.838

3 讨 论

自我国开始结核病的规范化管理治疗以来,结核患者一直能够得到国家规范化的免费抗结核治疗。虽然经过近 20 年的规范化管理治疗,但我国的结核病患者数量并没有明显下降,目前居全球第 2 位。随着实验室检测技术的发展,越来越多的耐药结核病患者被发现,结核分枝杆菌耐药株的传播也导致了我国耐药结核病患者数量居高不下^[11],使我国成为全球耐药结核病患者高负担国家之一。RFP 是目前结核病治疗中最常用,也是最重要的一种药物。根据 WHO 的推荐,耐 RFP 的结核病患者可按照耐多药结核病患者进行治疗,因此,RFP 耐药情况检测在肺结核患者中至关重要。

本研究中,3 种检测方法均获得结核分枝杆菌 RFP 药敏试验结果的患者有 77 例,其中有 63 例继发性肺结核、12 例空洞型肺结核、2 例浸润性肺结核;40 例为复治结核病患者。由于本院是省级结核病定点医院,收治的多是复治、耐药结核病患者,故本研究中 RFP 耐药率高于全国平均水平,但与全国复治结核患者 RFP 耐药率基本一致^[4]。

目前,常见的实验室结核分枝杆菌耐药株检测方法有传统的细菌学药敏检测技术、液体药敏检测技

术、分子生物学耐药快速筛查等技术^[12-15]。传统的细菌学药敏检测技术的缺点是耗时长,但液体药敏检测技术缩短了这一时间,MIC 法仅需 7~10 d 即可报告药敏试验结果。而分子生物学方法 1 d 内即可获得药敏检测结果,常用的分子生物学检测技术有 MMCA 法、Gene-Xpert 法、线性探针、基因芯片等,它们主要通过检测结核分枝杆菌的特异性靶基因是否存在基因突变来评估结核分枝杆菌对相应药物的耐药性,而且自动化程度高,检测结果与传统细菌学药敏试验结果基本一致,故在临床逐渐被接受和推广。

本研究结果显示,MMCA 法检测结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率最高,MIC 法次之,Gene-Xpert 法最低,但三者的差异均无统计学意义($P>0.05$);而且在不同性别和年龄段患者中,结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率差异也均无统计学意义($P>0.05$)。对于分子生物学检测,菌量是不可忽视的一个问题,含菌量低的标本可能导致核酸提取的假阴性;而含菌量高的标本,因野生型模板背景较高时,易导致非特异性扩增,产生假阳性结果。这些原因都可能导致表型药敏试验和分子药敏试验结果不一致。基于核酸的碱基突变检测也不能完全覆盖所有的基因突变位点,也有可能导致假阴性结果的存在。因此,可以利用分子药敏试验和表型药敏试验互补的检测方法进行药敏试验筛查,提高检测灵敏度和特异度。本研究中结果显示,不同菌量标本 3 种检测方法结核分枝杆菌对 RFP 的耐药率差异无统计学意义($P>0.05$),这可能与样本量较少有关,后期可以加大样本量进行研究,进而发现分子药敏试验和表型药敏试验之间的差异。

MMCA 法和 Gene-Xpert 法均是通过检测 RFP 的 rpoB 基因上的 507~533 共 81 bp 耐药决定区的基因序列,通过检测碱基突变来确定 RFP 的耐药信息,与传统的细菌学药敏试验相比,有较好的一致性,且灵敏度和特异度均较高,能够在短时间内检测出 RFP 的耐药基因 rpoB 的突变信息。MIC 法是通过抗结核药物技术处理后按照一定的药物浓度加入 MIC 中,再加入一定量的结核分枝杆菌,经过一定时间的培养,从而判断结核分枝杆菌是否对该药物耐药的一种新型细菌学耐药检测技术^[16]。该方法受 MIC 加工工艺和药粉质量的影响,对药敏试验结果可能会存在一定的影响,因此,目前应加强 MIC 的质量控制工作。本研究在药敏试验检测过程中,参加了中国疾病预防控制中心国家结核病参比实验室的药敏试验室间质量控制,取得了优秀成绩,但此次质量控制覆盖的药物种类较少,主要是常见的抗结核药物,质量控制药物较少,这也是结核分枝杆菌药敏试验检测室间质量控制的发展方向。

此外,MMCA 法、Gene-Xpert 法、MIC 法 3 种方法在检测时间、检测费用、人力成本方面也有区别,3 种方法都是结核分枝杆菌的新检测技术,需要经过培训的专业技术人员进行操作。MMCA 法和 Gene-

Xpert 法是分子生物学检测技术,检测时间均短于细菌学检测技术 MIC 法;检测费用 Gene-Xpert 法最高, MIC 法最低。这 3 种方法需要临床医生根据患者病情和其他多方面因素进行选择,并可在耐多药结核病防治领域中进行推广和应用^[17]。

综上所述,MMCA 法、Gene-Xpert 法和 MIC 法在临床上检测结核分枝杆菌对 RFP 的耐药性结果无明显差异,均具有较高的灵敏度和特异度,可结合临床实际需求选择药敏检测技术。

参考文献

[1] 王鸿,徐鹏,陈玲,等.结核分枝杆菌吡嗪酰胺异质性耐药研究[J].遵义医学院学报,2019,42(2):172-176.

[2] 余卫业,谭卫国,罗一婷,等.2018 WHO 全球结核报告:全球与中国关键数据分析[J/CD].新发传染病电子杂志,2018,3(4):228-233.

[3] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等.2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J].中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.

[4] 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.

[5] 陈伟,夏愔愔,李涛,等.2015 年全球及中国结核病疫情形势分析[J].结核病与肺部健康杂志,2016,5(1):32-36.

[6] SHARMA K, SHARMA M, SINGH S, et al. Real-time PCR followed by high-resolution melting curve analysis: a rapid and pragmatic approach for screening of multidrug-resistant extrapulmonary tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2017, 106(9): 56-61.

[7] 李燕,邵燕,陈诚,等.高分辨率熔解曲线技术检测耐利福平结核杆菌[J].江苏预防医学,2017,28(2):121-123.

[8] ULLAH I, SHAH A A, BASIT A, et al. Rifampicin resis-

tancemutations in the 81 bp RRDR of rpoB gene in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using Xpert MTB/RIF in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan: a retrospective study[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(8): 413-418.

[9] 孙蕊,王志锐,穆成,等. Xpert Mtb/RIF、痰涂片和培养在疑似肺结核诊断中的对比研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(1): 10-12.

[10] 刘红伟,李晓非,张建瑞,等.微孔板培养法对结核分枝杆菌一线药物耐药性分析及应用[J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(9): 1110-1113.

[11] 高谦,梅建.传播才是造成我国结核病高耐药率的主要原因[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(11): 1091-1096.

[12] 李瑜琴,陈玲.耐药结核病实验室诊断方法的研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25(12): 8-11.

[13] 梁愈,吴桂辉,黄涛,等.利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术在结核病诊断中的研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2019, 16(1): 242-245.

[14] 余丽,李海成,黎贞燕,等.结核菌及其耐药性不同检测方法的临床应用评价[J]. 广东医学, 2017, 38(2): 190-193.

[15] 刘艳,古丽比克·木拉提,玛力亚木·阿布力提甫,等.荧光 PCR 熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐药基因的结果分析[J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(9): 959-963.

[16] 李静,王智存,白广红,等. MicroDSTTM 微孔板检测法对抗结核一、二线药物敏感性试验的临床价值[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(5): 583-587.

[17] CHÖN T, MIOTTO P, KÖSER C U, et al. Mycobacterium tuberculosis drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives[J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(3): 154-160.

(收稿日期:2021-01-20 修回日期:2021-06-12)

(上接第 2650 页)

[10] 黄亚军,孙佳,赵艳丽. β -HCG、PCT、CRP、hs-CRP 在胎膜早破中预测宫内感染的意义[J]. 中国医师杂志, 2020, 22(7): 1091-1093.

[11] 李杰,张莉. sTREM-1 含量、血降钙素原和 C-反应蛋白在肝硬化腹水非多形核细胞性自发性细菌性腹膜炎的诊断意义[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(6): 456-460.

[12] 杨帆,冯亚民,齐良刚. 血清炎性指标与内毒素及 sTREM-1 在肺癌患者术后肺部感染中的临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(19): 2916-2920.

[13] 周启立,刘利蕊,郭健,等. 白细胞介素-6、降钙素原、C-反应蛋白对足月新生儿社区获得性败血症晚发型的早期诊断价值[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(8): 1770-1773.

[14] 曾令梅,王缙禹. PCT、CRP、GRA%联合血培养检测在新生儿败血症诊断中的应用[J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(8): 1057-1059.

[15] 曾敬芳,李娟,李雪梅,等. PEWS、NEWS、NCIS 在新生儿败血症病情评估中的预测价值研究[J]. 中国医学创新,

2019, 16(30): 151-155.

[16] 岳少杰,王铭杰,林锦. 早产儿早发型败血症的诊断与抗生素使用建议:湖南省新生儿科专家共识[J]. 中国当代儿科杂志, 2020, 22(1): 1-6.

[17] 孙溯荫. 血培养联合血清 PCT 和 hs-CRP 检测在诊断新生儿败血症中的应用分析[J]. 中国实用医药, 2018, 13(18): 28-29.

[18] 李俊乔,周启立,刘利蕊,等. C-反应蛋白、白细胞介素-6 及降钙素原在新生儿早发型败血症中的诊断价值[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(12): 2746-2748.

[19] 王昕莉. 依达拉奉治疗老年急性脑出血的疗效及对患者血清 HMGB-1、CRP 表达的影响[J]. 中国医学创新, 2020, 17(9): 57-60.

[20] 查丽,胡金绘,朱红利,等. 胰石蛋白对早发型新生儿败血症的早期诊断价值[J]. 中国医药导报, 2018, 15(24): 88-91.

(收稿日期:2021-01-03 修回日期:2021-06-11)