

• 综 述 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2025.01.025

耐多药结核病实验室检测技术进展*

刁婷婷^{1,2}, 张红吉^{1,2}, 欧阳兵¹, 刘超³综述, 李晓非^{1△}审校

1. 云南省昆明市第三人民医院/云南省传染病临床医学中心, 云南昆明 650041; 2. 大理大学公共卫生学院, 云南大理 671003; 3. 曲靖医学高等专科学校公共卫生与健康管理学院, 云南曲靖 655100

摘 要:耐多药结核病(MDR-TB)是指对包含异烟肼和利福平同时在内的至少 2 种以上一线抗结核药物耐药的结核病,其严重威胁着人类的健康和生命,因此早期快速检测耐药情况是 MDR-TB 患者有效治疗的关键。当前临床 MDR-TB 诊断主要以表型药物敏感性试验(pDST)检测为主,但 pDST 检测耗时长,一定程度上延误患者最佳治疗时机,而基因型药物敏感性试验(gDST)则能在较短时间内完成耐药检测。目前在 MDR-TB 诊断的研究中,pDST 检测联合 gDST 检测是研究热点,但仍处于探索阶段,缺少多中心、大样本、前瞻性研究报道。该文对 MDR-TB 的实验室检测技术进行综述,以期使读者深入了解 MDR-TB 的诊断现状及未来研究方向,为 MDR-TB 的快速诊断及治疗提供参考或借鉴。

关键词:结核病; 耐多药; 检测; 表型药物敏感性试验; 基因型药物敏感性试验

中图法分类号:R521;R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2025)01-0131-06

Advances in laboratory detection techniques for multidrug-resistant tuberculosis*

DIAO Tingting^{1,2}, ZHANG Hongji^{1,2}, OUYAN Bing¹, LIU Chao³, LI Xiaofei^{1△}

1. The Third People's House of Kunming/Yunnan Clinical Center for Infectious Diseases, Kunming, Yunnan 650041, China; 2. School of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan 671003, China; 3. School of Public Health and Health Management, Qujing Medical College, Qujing, Yunnan 655100, China

Abstract: Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) refers to tuberculosis that is resistant to at least two first-line anti-tuberculosis drugs including isoniazid and rifampicin, which seriously threatens human health and life. Therefore, early and rapid detection of drug resistance is the key to effective treatment of MDR-TB patients. At present, the clinical diagnosis of MDR-TB is mainly based on phenotypic drug sensitivity test (pDST), but pDST takes a long time, which delays the best treatment opportunity for patients to some extent, while genotypic drug sensitivity test (gDST) can complete drug resistance detection in a short time. At present, in the research of MDR-TB diagnosis, pDST detection combined with gDST detection is a research hotspot, but it is still in the exploratory stage, lacking of multicenter, large sample and prospective research reports. In this paper, the laboratory detection techniques of MDR-TB are reviewed, in order to make readers deeply understand the diagnosis status and future research direction of MDR-TB and provide reference for the rapid diagnosis and treatment of MDR-TB.

Key words: tuberculosis; multidrug resistance; detection; phenotypic drug sensitivity test; genotypic drug sensitivity test

结核病(TB)是呼吸道传染病之一,结核分枝杆菌(MTB)是引起 TB 发病的主要病原体。人体被 MTB 感染后可引起相应一系列临床症状或影像学表现,严重危害患者健康,且 TB 排在全球传染病死亡的首位。肺是最常见的感染部位,亦可引起脑膜、颈部淋巴、肠、骨等多部位感染。TB 患者不规律用药、治疗中断是耐药产生的常见原因。人口流动的加速、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染率的升高进一步加快 TB 在全球的流行速度,部分 TB 患者在经历了好转、恶化反

复交替、长期不愈的诊疗过程后发展为耐药结核病(DR-TB),使人群感染耐药 MTB 的风险进一步增加^[1]。

在 DR-TB 中,耐多药结核病(MDR-TB)和利福平耐药结核病(RR-TB)是目前全球 TB 防治工作的难点和重点之一,是 2035 年实现全球终止 TB 流行目标的主要障碍^[2]。据世界卫生组织(WHO)公布的数据,自 2019 年全球新型冠状病毒感染暴发以来,全球 TB 的发病趋势发生了很大的变化:与 2019 年相比,

* 基金项目:云南省昆明市科技计划项目(2023-1-NS-008)。

△ 通信作者, E-mail:1971069866@qq.com。

2020 年和 2021 年新诊断的 TB 患者数和报告的 TB 患者数之间的差距明显增大,2020 年新诊断 TB 患者数和报告的 TB 患者数在全球范围内大幅减少,到 2021 年 TB 患者数增多,2022 年全世界有 TB 患者 1 060 万例,其中有 41 万例是 MDR-TB 患者^[3]。可见耐药问题仍然是全球 TB 防控重点,通过监测耐药特征,有利于制订出相应的防治策略,实现精准防控。

1 MDR-TB 的耐药机制

1.1 固有性耐药 MTB 的内在抗性与其增厚、富含脂质的细胞包膜有关。在跨膜运动中有些药物可通过酶促反应被裂解或药物化学结构改变导致失效。有研究表明,编码细胞壁通道蛋白的 MspA 基因突变引起的通道蛋白的丢失可能导致 MTB 对链霉素(SM)耐药。增加细胞内存活蛋白(Eis)可导致机体对乙酰化卡那霉素 A 产生低水平耐药^[4]。

MTB 存在许多外排系统,在不同条件下不同外排系统的表达有不一样的耐药性。被确定为编码外排泵的相关基因约 20 个,集中在主要协同转运蛋白超家族(MFS)、耐药结节细胞分化家族(RND)、小多重耐药家族(SMR)^[5]。与药物外排有关的 30% 异烟肼(INH)和 3% 利福平(RFP)MTB 分离株未显示任何已知耐药相关基因突变。乙胺丁醇(EMB)和 INH 的耐药与 Rv2459(iefA)基因的转录增加有关。在未有 RFP 和 INH 耐药相关的基因突变的耐药 MTB 菌株中药物外排泵(EPs)发挥了重要作用^[6]。

亲本中没正在转移的水平基因是 MTB 的另一个耐药特性。有研究表明,水平基因转移可能不是获得抗菌药物耐药性的驱动因素。MTB 的绝大多数耐药表型可用染色体突变来解释,而不是用耐药质粒或其他可移动遗传元件来解释。

1.2 获得性耐药 抗结核药物有一线、二线药物之分,不同药物根据其作用机制发挥对 MTB 的杀菌、抑菌作用。一线药物治疗效果好,不良反应较少,如 INH、RFP、EMB、吡嗪酰胺(PZA)等。而二线药物的不良反应较大,治疗效果不如一线药物,如左氧氟沙星(Lfx)、SM、氯法齐明(Cfz)、利奈唑胺(Lzd)等^[7]。

RFP 是由利福霉素衍生而来的半合成抗菌药物,在转录过程中分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的 β 亚基与 RFP 结合,抑制转录的发生。RFP 抗性常被认为是 rpoB 基因 81 bp 区域的氨基酸替换的结果。此外,rpoB 基因的缺失或插入也会使 RFP 产生抗性,密码子 450、445 和 435 的替换最常见,其中密码子 450 和 445 均产生高水平抗性,密码子 435 多产生中等水平抗性^[8]。有研究表明,MTB 通过核糖基化使 RFP 失活产生耐药,可能是机体对 RFP 低敏感的原因。

INH 是被 katG 酶激活的前体药物^[9],对快速生长的 MTB 有杀菌作用。菌酸是细胞壁构建所必需的物质,INH 可抑制菌酸的合成从而抑制细胞壁的构建。kasA、ahpC 基因突变在 INH 耐药中的作用尚不

清楚^[10]。katG 基因突变使过氧化氢酶-过氧化物酶转化为 INH,使 MTB 活性降低,导致耐药。在 93% 的 INH 耐药菌株中,katG 基因最常见突变是密码子 S315T 上的丝氨酸到苏氨酸的替换。在 32% 的 INH 耐药菌株中依赖于遗传位点 mabA(fabG1)-inhA 操纵子区域的突变。此外,inhA 基因开放式阅读框(ORF)/启动子突变、ndh 基因突变导致氧化还原对 NAD⁺/NADH 比例改变也可使 INH 发生抗性。

PZA 是一种前体药物,被分枝杆菌 PZA 酶激活形成吡嗪酸,质子化的吡嗪酸起杀菌作用^[11]。PZA 的耐药性主要与 pncA 基因及其周围区域的基因突变有关,在 72.0%~99.9% 的 PZA 耐药分离株中发现了 pncA 基因突变^[12]。

EMB 是细胞壁阿拉伯糖基转移酶的抑制剂,可抑制阿拉伯甘露聚糖和阿拉伯半乳糖的合成,从而抑制 MTB 活性。其抗性与 embB 基因突及其操纵子 embCAB 基因突变有关^[13]。在 68% 以上的 EMB 耐药菌株中,密码子 306 的突变最常见。Rv3806c 基因突变的产物可与 EMB 竞争酶活性位点,可使 embB 基因突变产生增殖效应^[14]。Rv2820c 基因和 Rv3300c 基因编码的假设蛋白可导致 EMB 耐药,但其具体耐药机制有待研究。

SM 是从灰色链霉菌中分离出来的氨基糖苷,可抑制翻译过程干扰蛋白质合成^[15]。rpsL 基因突变产生耐药与密码子 43 上的精氨酸取代赖氨酸有关,同时密码子 88 上的基因突变也与 SM 抗性有关。rrs 基因突变产生抗性常发生在密码子 530 和 910 上^[16]。SM 基因突变表现出广泛的可变性,取决于菌株谱系或地理环境。例如,rpsL 基因突变的发生率在亚洲相对较高,而 rrs 基因突变的发生率在欧洲和美洲相对较高^[17]。此外 gidB 基因编码的核糖体 RNA(rRNA)甲基转移酶的缺失也可导致耐药。

氟喹诺酮类药物耐药位点集中在喹诺酮类药物耐药决定区(QRDRs)的基因中^[18]。莫西沙星(Mfx)和 Lfx 是 TB 治疗的常见氟喹诺酮类药物,主要作用在肺泡巨噬细胞和肺部病变部位中,存在交叉抗性。gyrA 基因突变和较少见的 gyrB 基因突变都导致了耐药,gyrA 耐药区主要在密码子 74~95,而 gyrB 耐药区主要位于密码子 500~540。

贝达喹啉(Bdq)是二芳基喹啉类药物,可抑制分枝杆菌三磷酸腺苷合酶的合成。其耐药与分枝杆菌 atpE、Rv0678 和 pepQ 基因的变异有关。atpE 基因突变破坏了 Bdq 与其靶点的结合,导致耐药。Rv0678 基因突变可抑制 mmpS5 和 mmpL5 基因,可通过抑制外排活性介导 Bdq 耐药,同时 Rv0678 基因突变也可介导 Cfz 耐药,从而导致 Cfz 与 Bdq 之间的交叉耐药^[19]。

Lzd 是一种核糖体翻译抑制剂,在阻止 70S 起始复合物的形成过程中与核糖体 50S 亚基结合,导致翻译早期便抑制细菌蛋白质合成。其耐药性与 23SRAN 的

rplC 和 rrl 基因结构域的点突变有关^[20]。

Cfz 是一种吩嗪类化合物,通过干扰 MTB 的核酸代谢,与其 DNA 结合,抑制依赖 DNA 的 RNA 聚合酶,阻止 RNA 的合成,从而抑制细菌蛋白的合成,发挥杀菌作用。当前发现 Cfz 的耐药性与 Rv0678、Rv1973c 和 Rv2535c 基因突变有关,但尚未确定其耐药机制^[19]。

德拉马尼(Dlm)是硝基二氢咪唑并噻吩类衍生物,通过抑制 MTB 细胞壁酮基分枝菌酸及甲氧基分枝菌酸的合成发挥杀菌作用^[21]。Dlm 与目前已知抗结核药物没有交叉耐药,天然耐药少见(<1%)。ddn、fgd1、fbiA、fbiB、fbiC 基因中任一辅酶基因突变都可能引起 Dlm 产生耐药。ddn 基因突变通过破坏 F420 依赖的硝基还原酶途径导致 Dlm 耐药。fbiA、fbiB 和 fbiC 基因非同义突变可编码合成 F420 的酶,损害 Dlm 依赖酶活性。fgd1 基因突变会导致 F420 氧化积累,导致 Dlm 抗性^[22]。

2 MDR-TB 的检测方法

MTB 检测是确诊 TB 的特异性方法,目前采用任

何单一形式的药物敏感性试验(DST)方法均无法完全满足临床 DR-TB 检测的需求,因此,采用表型药物敏感性试验(pDST)与基因型药物敏感性试验(gDST)联合检测,优势互补可一定程度上提高耐药 MTB 的检出率,缩短诊断时间。

2.1 pDST pDST 检测存在成本较高、耗时长及可比性较差等特点,分为比例法和绝对浓度法。当前传统比例法仍是 WHO 全球耐药检测项目中推荐的对耐药菌株的(耐药菌株占总菌株比例>1% 时)较标准、可靠、敏感的实验室检测方法,主要操作步骤为在含有抗结核药物的培养基中对 MTB 进行培养后,观察 MTB 生长是否受抑制。因 pDST 中 MTB 生长缓慢,所以在临床上无法满足对 TB 的诊断要求。WHO 基于当前的研究现状和部分地区研究的数据,推荐一些耐药基因及常见的基因突变的位点用于预测抗结核药物耐药,见表 1^[23]。但这些基因突变位点在不同国家、地区对 MDR-TB 的预测价值和临床指导意义还值得进一步研究。

表 1 抗结核药物常见耐药相关基因及其作用机理

药物名称	耐药相关基因	作用机理
RFP	rpoB	抑制 RNA 合成
INH	katG, inhA	抑制细胞壁合成
PZA	pncA, rpsA, panD	抑制脂肪酸合成酶或膜转运
EMB	embB	抑制细胞壁合成
SM	rpsL, rrs, gidB	抑制蛋白质合成
氟喹诺酮类	gyrA, gyrB	抑制 DNA 旋切酶
Bdq	atpE, Promotor/mmpR	抑制 ATP 合成
Lzd	rrl, rplC	抑制蛋白质合成
Cfz	Promotor/mmpR	外排泵 Mmpl5 过表达
Dlm	ddn, fgd1, fbiA/B/C	抑制霉菌酸合成
环丝氨酸或特立齐酮	alr, ald, ddl, cycA	抑制细胞壁合成
亚胺培南-西司他丁	—	抑制细胞壁合成
美罗培南	Rv2421c-Rv2422 intergenic region	抑制肽聚糖合成
丙硫异烟胺或乙硫异烟胺	ethA, ethR	抑制细胞壁合成
对氨基水杨酸	thyA, thyX-hsdS, 1	抑制 DNA 前体的合成

注:—表示无数据。

2.2 gDST 基因突变导致的耐药是当前研究的一个热点,通过检测基因突变位点来快速诊断 DR-TB 的技术逐渐受到关注,探索出新的分子检测方法快速检测出耐药变得尤为重要。以下主要阐述 DNA 测序、荧光探针聚合酶链反应(PCR)熔解曲线法、线性探针(LPA)、基因芯片、Xpert MTB/RIF、核酸质谱、规律成簇的间隔短回文重复序列及相关蛋白(CRISPR-Cas)系统这几种 DR-TB 的检测方法。

2.2.1 DNA 测序 DNA 测序是指对 MTB 全部基因组或特定基因片段进行测序,测序后与已有的标准

株基因序列进行对比,发现耐药突变基因。MTB 存在于单一环状染色体中,编码 4 018 个蛋白基因,基因组全长 4 411 532 bp,基因组中鸟嘌呤、胞嘧啶含量高,且同其他微生物序列无相似性^[24]。全基因组第 1 代测序技术是 Sanger 法,现今已发展至第 4 代。21 世纪前,以第 1 代 Sanger 测序和第 2 代高通量测序(NGS)为主;21 世纪以第 3 代单分子测序和第 4 代纳米孔测序为主。LIU 等^[25]以 pDST 为参考标准,基于纳米孔的靶向下一代测序(NanoTNGS)特异度为 83.33%~100.00%,RFP、INH 灵敏度分别为

93.53%、89.72%。与 Xpert MTB/RIF 相比, NanoTNGS 对 RFP 的灵敏度提高了 9.73%。当前, 在全球测序市场中, 第 2 代仍占有绝对优势。与前两代测序技术比较, 第 3 代测序技术的最大特点是能够实时测定单分子, 但目前该技术尚不成熟, 相比第 2 代测序, 成本更高; 第 4 代测序是基于电信号的高成本单分子测序, 有测序读长长, 速度快, 可实时监控测序数据, 方便携带等优势。DNA 测序的快速发展, 使 MTB 基因测序越来越快速和准确, 成本也不断降低, 有利于发现新的耐药机制^[26]。目前, 由于 DNA 测序对技术人员要求高、检测设备昂贵等问题, 其难以在短期内被用于临床 MTB 检测。

2.2.2 荧光探针 PCR 熔解曲线法 1993 年实时荧光 PCR 技术开始被报道, 因其操作简便, 无需扩增后处理、通量高和污染少等优点被广泛应用于多个领域。对 MTB 的检测具有快速、准确的特性。荧光探针 PCR 熔解曲线法是基于闭合管、多通道、熔解曲线分析的实时 PCR 检测方法, 检测 MTB 复合群从野生型转变为突变型的熔解温度, 对 MTB 耐药进行定性分析^[27]。荧光探针 PCR 熔解曲线法在操作过程中对技术要求较高, 容易出现多种不一样的结果, 因此要求技术人员专业能力过硬。可用于 SM、EMB 和氟喹诺酮类药物的耐药检测。对于一线抗结核药物检测的灵敏度为 87%~89%。王佩等^[28]以微孔板法药敏试验为参照, 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对 INH 的灵敏度、特异度分别为 96.20%、95.28%。对 RFP 的灵敏度、特异度分别为 93.62%、94.58%。

2.2.3 LPA LPA 检测耐药 MTB 的存在, 通过使用 PCR 扩增和在固定有特异性寡核苷酸探针的条带上杂交来确定 TB 和耐药性基因突变。通过观察有色条带来表明是否存在耐药 MTB。LPA 需要 1~2 d 获得结果, 它由德国 HAIN Lifescience 公司开发, 能通过对 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因突变进行检测从而判断 MTB 是否对 RFP 和 INH 耐药, 其检测限较低, 检测周期短, 多用于 MDR-TB 的筛查^[29]。被 WHO 推荐用于 RFP 和 INH 耐药检测及广泛耐药结核病(XDR-TB)的检测。张耀辉等^[30]以 MGIT906 培养为标准, MGIT906 和二代 LPA 技术对 RFP 和 INH 进行耐药性检测, Kappa 值分别为 0.84 和 0.69。

2.2.4 基因芯片 基因芯片的原理是杂交测序, 即实验组与一组已知序列的核酸探针杂交进行序列测定。可快速引起 MTB 与耐药性相关基因突变的检测, 主要用于 MTB 感染早期检测, 通过 *rpoB*、*katG*、*inhA* 常见耐药基因检测基因突变, 快速检测 MTB 的耐药性^[31]。具有检测时间短, 通量高, 操作便捷等特点。5~8 h 内可同时检测出 INH 和 RFP 耐药。有研究表明, 基因芯片诊断 MDR-TB 的灵敏度和特异度分别为 64.62% 和 97.75%^[32]。基因芯片在快速检测过程中也有很多不足之处比如对于样品准备与标记较复杂, 检测成本较高, 仪器设备相对昂贵等。

2.2.5 Xpert MTB/RIF WHO 推荐使用一种新的、快速的、自动化的、基于试剂盒的核酸扩增技术 Xpert MTB/RIF (美国 Cepheid 公司)^[33]。Xpert MTB/RIF 是一种单一检测, 是以 MTB 的 RNA 聚合酶 *rpoB* 基因的 81 bp 核心序列为靶标, 采用半巢式实时半定量 PCR 的方法进行检测, 在开始测试后 2 h 内检测出 MTB 复合体。研究表明, 以 pDST 为参考标准, Xpert MTB/RIF 的特异度为 97.32%, 灵敏度为 94.44%, 多用于早期诊断 TB^[34]。第 2 代 Xpert MTB/RIF Ultra 增加 IS6110 和 IS1081 个靶点, DNA 体积明显扩增, 其检测下限为 Xpert MTB/RIF 的 1/8 (<15 CFU/mL 与 100~120 CFU/mL), 相比 Xpert MTB/RIF 提高了检测灵敏度, 但特异度却有所降低, 对 RFP 耐药性检测研究未见灵敏度或特异度升高^[35]。有国外学者认为, Xpert MTB/RIF 检测可提高 MDR-TB 患者的临床疗效^[36]。陈军等^[33]研究表明, 在 309 例 RFP 耐药的菌株中, MDR-TB 占 77.35%。第 3 代 Xpert MTB/XDR 开始推出, Xpert MTB/XDR 应用 10 色荧光技术, 约 90 min 即可出结果, 可用于 Xpert MTB/RIF 或 Xpert MTB/RIF Ultra 后续的多种 MTB 耐药性检测, 以帮助 MDR-TB 和 XDR-TB 治疗方案的制订。CHEN 等^[37]招募 371 例 TB 患者以全基因组测序 (WGS) 结果为标准, Xpert MTB/XDR 法对所有药物的耐药检测准确率为 95.2%~99.0%^[37]。

2.2.6 核酸质谱 1975 年质谱技术开始尝试用于鉴定细菌, 在上世纪八十年代软电离技术出现后, 质谱技术才逐渐用于细菌鉴定。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 是近些年来快速发展用于细菌鉴定的基于蛋白质谱分析的一种新型软电离质谱技术, 具有快速、简单、廉价等特点。使用激光照射基质分子与标本, 照射过程中基质分子与标本形成结晶薄膜, 基质分子吸收照射的能量使标本吸附解离, 电荷转移到基质标本之间进行, 使标本分子电离, 标本离子在电场的作用下快速进入飞行管道, 按离子的质荷比和飞行时长的平方之比这一常数可探测到不同质荷比的离子, 从而获得的质谱图区分并鉴定不同细菌是 MALDI-TOF MS 的原理。2004 年, HETTICK 等^[38]首先尝试使用 MALDI-TOF MS 来鉴定 MTB。随着 MALDI-TOF MS 的发展使用, 关于药物敏感性快速检测技术 MALDI Biotyper (MBT-ASTRA) 开始进入大众视野。ALCOLEA-MEDINA 等^[39]研究表明常规药敏检测方法和 MBT-ASTRA 相比一致率为 99.8%。WU 等^[40]以 pDST 为参考, MALDI-TOF MS 与 pDST 的一致率分别为: RFP (94.6%)、INH (90.1%)、EMB (79.2%)。药敏检测至少 18~24 h 出结果, 对于生长缓慢或者敏感性不明确的细菌, 检测时间可能会更久。当前关于 MALDI-TOF MS 的缺陷开始显现, MALDI-TOF MS 存在价格昂贵、对多数标本需进行培养后才能鉴定、数据库

不够完整等局限。

2.2.7 CRISPR-Cas CRISPR 是原核生物基因组内的一段重复序列, Cas 是位于 CRISPR 序列两侧的一类较大的多态性家族基因。CRISPR-Cas 能在一段 RNA 指导下定向寻找目标 DNA 序列, 然后将该序列进行切除, 是一种细菌适应性免疫系统, 因其识别和剪切特定序列而被应用于基因编辑领域^[41]。由于结构、功能上的差异, 科学家们将 CRISPR-Cas 系统分为两大类, 6 种型, 33 种亚型。相较于传统的检测方法, CRISPR-Cas 系统表现出快速、灵敏度高、特异性好、适用范围广等诸多优点。张治国等^[42]对 102 例 TB 患者和 100 例非 TB 患者的支气管肺泡灌洗液标本进行 CRISPR-Cas13a 检测, 以 Xpert 检测结果为参照, 其灵敏度为 97.1%。AI 等^[43]采用 CRISPR-Cas12a 对 MTB 进行检测, 其检测灵敏度为 79%, 高于 Xpert 检测。CRISPR-Cas 也有其局限性, 目前的检测方法无法满足患者随访的需求, 大样本检测实验较少等。CRISPR-Cas 在已发表的国内外学者的小样本研究中展示出其强大的诊断效能。

3 结论与展望

MDR-TB 是全球 TB 防控工作的重点难题之一。实验室检测能尽早诊断 MDR-TB 患者, 有助于临床及时为患者制订适宜的抗结核治疗方案, 一定程度上减少耐药的产生, 控制 MDR-TB 的传播。本文阐述了 MDR-TB 的耐药机制: 固有性耐药和获得性耐药, 为 MDR-TB 检测技术的研发提供依据。随着 MDR-TB 诊断技术的研发, 各类 gDST 表现出很大的优势, 但 pDST 仍作为临床 MDR-TB 检测的金标准, 而 gDST 因其检测速度快、能检测出特定的耐药位点用于辅助 MDR-TB 的临床诊断, 二者互补可为制订适用于我国 MDR-TB 的治疗方案提供更多的临床评估数据。

目前 MDR-TB 检测仍面临许多挑战, 例如: (1) MDR-TB 耐药机制非常复杂, 至今为止尚未完全阐明, 主要认为是药物作用靶基因突变所致; (2) 传统的 pDST 检测培养时间较长, 对 MTB 数量及培养基的药物浓度要求较为准确, 受限于各个医院的具体情况, 限制了对 MDR-TB 诊断的时效性; (3) gDST 虽然可快速发现明显的耐药机制, 但该类技术特异度较低, 经济成本较高, 且通常要求标本中耐药 MTB 含量高于 20.0%, 易造成漏检。

近年来, 临床上多推荐 pDST 技术和 gDST 技术联合检测 MDR-TB, 最大程度给予患者有效的治疗。随着分子生物学的发展, DNA 测序、Xpert MTB/RIF、CRISPR-Cas 这 3 种分子检测技术已成为目前 MDR-TB 诊断的一个趋势, 在此基础上不断地探索出快速、低成本、敏感性好的方法在未来仍值得期待, 为早日实现终止 TB 的目标不断努力。

参考文献

[1] 沈洁, 吴妹英, 李苏梅. 初治和复治肺结核患者外周血淋

- 巴细胞亚群的变化及其临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(2): 208-212.
- [2] 王坚杰, 周美兰, 任欣, 等. 2007—2020 年武汉市耐药肺结核高危人群耐药流行趋势[J]. 中华疾病控制杂志, 2022, 26(11): 1353-1359.
- [3] BAGCCHI S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. Lancet Microbe, 2023, 4(1): e20.
- [4] PANG A H, GREEN K D, CHANDRIKA N T, et al. Discovery of substituted benzyloxy-benzylamine inhibitors of acetyltransferase eis and their anti-mycobacterial activity [J]. Eur J Med Chem, 2022, 242: 114698.
- [5] GHAAVAND H, KARGARPOUR KAMAKOLI M, KHANIPOUR S, et al. Scrutinizing the drug resistance mechanism of multi- and extensively-drug resistant Mycobacterium tuberculosis: mutations versus efflux pumps[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, 8: 70.
- [6] MANSON A L, COHEN K A, ABEEL T, et al. Genomic analysis of globally diverse Mycobacterium tuberculosis strains provides insights into the emergence and spread of multidrug resistance [J]. Nat Genet, 2017, 49(3): 395-402.
- [7] 王仁凤. 抗结核杆菌肉桂醛衍生物及二甲双胍衍生物的合成与抗菌机制的初探[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [8] 王喜梅. MIRU-VNTR 位点及耐药基因突变与结核耐药相关性研究[D]. 芜湖: 皖南医学院, 2021.
- [9] NOROUZI F, MOGHIM S, FARZANEH S S, et al. Significance of the coexistence of non-codon 315 katG, inhA, and oxyR-ahpC intergenic gene mutations among isoniazid-resistant and multidrug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis: a report of novel mutations [J]. Pathog Glob Health, 2022, 116(1): 22-29.
- [10] 赵永, 林淑芳, 林建, 等. 125 株耐多药结核分枝杆菌的吡嗪酰胺耐药及 pncA 基因突变分析[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(10): 1079-1083.
- [11] JUNAID M, LI C D, LI J, et al. Structural insights of catalytic mechanism in mutant pyrazinamidase of Mycobacterium tuberculosis [J]. J bio struct dyn, 2021, 39(9): 3172-3185.
- [12] KHAN M T, MALIK S I, ALI S, et al. Pyrazinamide resistance and mutations in pncA among isolates of Mycobacterium tuberculosis from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 116.
- [13] WHO operational handbook on tuberculosis module 1: prevention tuberculosis preventive treatment [R]. Geneva: World Health Organization, 2020.
- [14] ROSSINI N O, DIAS M. Mutations and insights into the molecular mechanisms of resistance of Mycobacterium tuberculosis to first-line [J]. Genet Mol Biol, 2023, 46 (Suppl 2): e20220261.
- [15] 胡嘉琪. 多组学驱动的微生物天然产物的发现及生物合成研究[D]. 济南: 山东大学, 2023.
- [16] 杨彩虹, 张萍, 买买提艾力·艾合木提, 等. 高分辨率熔解曲线快速检测结核分枝杆菌对链霉素耐药情况的研究 [J]. 中国动物传染病学报, 2024, 32(1): 157-163.
- [17] THIDA O N, SAN L L, THAPA J, et al. Characterization

- of mutations conferring streptomycin resistance to multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Myanmar[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2018, 111: 8-13.
- [18] KAWAGUCHIYA M, URUSHIBARA N, AUNG M S, et al. Molecular characterization and antimicrobial resistance of streptococcus agalactiae isolated from pregnant women in Japan, 2017—2021[J]. *IJID Reg*, 2022, 4: 143-145.
- [19] ISMAIL N, PETERS R P H, ISMAIL N A, et al. Clofazimine exposure in vitro selects efflux pump mutants and bedaquiline resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63(3): e02141-18.
- [20] LIU B G, YUAN X L, HE D D, et al. Research progress on the oxazolidinone drug linezolid resistance[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9274-9281.
- [21] ABRAHAMS K A, BATT S M, GURCHA S S, et al. DprE2 is a molecular target of the anti-tubercular nitroimidazole compounds pretomanid and delamanid[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 3828.
- [22] YANG J S, KIM K J, CHOI H, et al. Delamanid, bedaquiline, and linezolid minimum inhibitory concentration distributions and resistance-related gene mutations in multi-drug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in Korea[J]. *Ann Lab Med*, 2018, 38(6): 563-568.
- [23] RUTH M, MATTEO Z, TAANE G C. Use of whole genome sequencing in surveillance of drug resistant tuberculosis[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018, 16(5): 433-442.
- [24] SHI J H, MENG S H, WAN L, et al. Deep N-terminomics of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv extensively correct annotated encoding genes[J]. *Genomics*, 2022, 114(1): 292-304.
- [25] LIU A M, LIU S, LV K Y, et al. Rapid detection of multidrug resistance in tuberculosis using nanopore-based targeted next-generation sequencing: a multicenter, double-blind study[J]. *Front Microbiol*, 2024, 15: 1349715.
- [26] 吴联朋, 夏丹丹, 徐克. 全基因组测序技术在耐药结核病诊断中的应用价值[J]. *温州医科大学学报*, 2024, 54(1): 42-46.
- [27] FILIPENKO M L, DYMOVA M A, CHEREDNICHENKO A G, et al. Detection of mutations in mycobacterium tuberculosis *pncA* gene by modified high-resolution melting curve analysis of PCR products[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 168(2): 264-269.
- [28] 王佩, 赵国连, 雷倩, 等. 荧光 PCR 探针熔解曲线法与微孔板法检测 MTB 耐药性的临床应用比较[J]. *中国防痨杂志*, 2021, 43(2): 132-138.
- [29] ACHARYA B, ACHARYA A, GAUTAM S, et al. Advances in diagnosis of tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(5): 4065-4075.
- [30] 张耀辉, 刘元. 二代线性探针技术在结核病诊断及耐药检测中的应用研究[J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(14): 2015-2018.
- [31] 董启珍, 赵承杰, 吴晓茹. 基因芯片技术在新发涂阳肺结核患者结核杆菌菌种鉴定及药敏试验中的应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(7): 1024-1028.
- [32] LU W, CHEN C, SHAO Y, et al. Evaluation of biochip system in determining isoniazid and rifampicin resistances of mycobacterium tuberculosis in sputum samples[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52953.
- [33] 陈军, 陈丽峰, 任易, 等. GeneXpert MTB/RIF 试验在检测利福平耐药及耐多药结核中的应用评价[J]. *国际检验医学杂志*, 2019, 40(2): 144-148.
- [34] 茹浩浩, 陈连勇, 杨星, 等. Xpert MTB/RIF 与结核分枝杆菌利福平耐药表型检测一致性分析[J]. *检验医学*, 2023, 38(11): 1032-1035.
- [35] SHAPIRO A E, ROSS J M, YAO M, et al. Xpert MTB/RIF and xpert ultra assays for screening for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults, irrespective of signs or symptoms[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 3(3): CD13694.
- [36] 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, 26(8): 997-1004.
- [37] CHEN X, LI R, GE S, et al. Rapid detection of extensive drug resistance by xpert MTB/XDR optimizes therapeutic decision-making in rifampin-resistant tuberculosis patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2023, 61(6): e183222.
- [38] HETTICK J M, KASHON M L, SIMPSON J P, et al. Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2004, 76(19): 5769-5776.
- [39] ALCOLEA-MEDINA A, FERNANDEZ M T C, MONTEL N, et al. An improved simple method for the identification of *Mycobacteria* by MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry) [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 20216.
- [40] WU X C, TAN G K, YANG J H, et al. Prediction of mycobacterium tuberculosis drug resistance by nucleotide MALDI-TOF-MS[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 121: 47-54.
- [41] LIU P, WANG X, LIANG J, et al. A recombinase polymerase amplification-coupled cas12a mutant-based module for efficient detection of streptomycin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 796916.
- [42] 张治国, 尚媛媛, 张旭霞, 等. CRISPR-Cas13a 检测在肺结核诊断中的价值[J]. *中国防痨杂志*, 2023, 45(6): 589-593.
- [43] AI J W, ZHOU X, XU T, et al. CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(1): 1361-1369.