

· 论著 ·

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

王佩 赵国连 雷倩 郑丹 崔晓利 周俊

【摘要】 目的 分析荧光 PCR 探针熔解曲线法与微孔板法药物敏感性试验(简称“药敏试验”)检测结核分枝杆菌(MTB)对抗结核药品耐药性结果的一致性及 MTB 基因突变与耐药的相关性,为临床诊疗优化提供参考。方法 搜集 2019 年 1—12 月分离自西安市胸科医院就诊患者并经鉴定确认的 343 株 MTB 临床分离株,菌株均进行了微孔板法药敏试验和荧光 PCR 探针熔解曲线法检测。以微孔板法药敏试验结果为参照,评价荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、莫西沙星和左氧氟沙星耐药性的检测效能,并分析荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的 MTB 基因突变与微孔板法药敏试验最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的相关性。结果 以微孔板法药敏试验结果为参照,荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、莫西沙星和左氧氟沙星耐药性的敏感度、特异度、*Kappa* 值分别为:96.20%(76/79)、95.28%(242/254)、0.88;93.62%(44/47)、94.58%(279/295)、0.79;96.88%(62/64)、94.96%(264/278)、0.86;93.33%(14/15)、95.37%(309/324)、0.61;92.31%(24/26)、97.16%(308/317)、0.80;91.18%(31/34)、99.35%(307/309)、0.92。荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结果与微孔板法表型药敏试验检测结果不一致的菌株中,发生异烟肼 *AhpC* 启动子区(-44~-30 及 -15~3 位点),利福平 *rpoB* 基因 507~512 位点,链霉素 *rrs* 基因 905~908 位点多位点突变和乙胺丁醇 *embB* 基因 406 位点突变的菌株,表型药敏试验耐药率较低,分别为 1/5、1/5、1/10 和 1/5;而发生异烟肼 *KatG* 基因 315 位点、利福平 *rpoB* 基因 529~533 位点、链霉素 *rpsL* 基因 43 位点突变的菌株,表型药敏试验耐药率较高,分别为 92.42%(61/66)、92.31%(36/39)和 95.74%(45/47)。结论 荧光 PCR 探针熔解曲线法与微孔板法药敏试验检测 MTB 对抗结核药品耐药性结果具有较好的一致性;MTB 对异烟肼、利福平、链霉素的耐药与其部分基因突变具有一定相关性。

【关键词】 分枝杆菌, 结核; 聚合酶链反应; 分子探针技术; 抗药性, 细菌; 对比研究

Comparison of the clinical application between fluorescence PCR probe melting curve and Micropore-plate method in determining the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* WANG Pei, ZHAO Guo-lian, LEI Qian, ZHENG Dan, CUI Xiao-li, ZHOU Jun. Clinical Laboratory, Xi'an Chest Hospital, Xi'an 710061, China
Corresponding author: LEI Qian, Email: 362685867@qq.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the consistency between fluorescence PCR probe melting curve and Micropore-plate drug sensitivity tests (MicroDST) in determining the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), as well as the correlation between MTB gene mutation and drug resistance, in order to provide reference for optimization of clinical diagnosis and treatment. **Methods** From January to December, 2019, a total of 343 MTB clinical isolates from patients in Xi'an Chest Hospital were collected, all the specimens were tested using fluorescence PCR probe melting curve and MicroDST. Based on the results of MicroDST, the detection efficiency of fluorescence PCR probe melting curve in MTB resistance of isoniazid, rifampin, streptomycin, ethambutol, moxifloxacin and levofloxacin were evaluated. And the correlation between the gene mutation of MTB detected by fluorescence PCR probe melting curve and the minimum inhibitory concentration (MIC) of MicroDST was analyzed. **Results** With reference of the results of MicroDST, the sensitivity, specificity, and *Kappa* value of fluorescence PCR probe melting curve for isoniazid, rifampin, streptomycin, ethambutol, moxifloxacin and levofloxacin were



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2021.02.006

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(2017JQ8016)

作者单位:710061 西安市胸科医院检验科(王佩、赵国连、郑丹、崔晓利),药剂科(雷倩),医学转化中心(周俊)

通信作者:雷倩,Email:362685867@qq.com

96.20% (76/79), 95.28% (242/254), 0.88; 93.62% (44/47), 94.58% (279/295), 0.79; 96.88% (62/64), 94.96% (264/278), 0.86; 93.33% (14/15), 95.37% (309/324), 0.61; 92.31% (24/26), 97.16% (308/317), 0.80; 91.18% (31/34), 99.35% (307/309), 0.92. Among the isolates, results of which by the fluorescence PCR probe melting curve were inconsistent with the phenotypic drug sensitivity, the lower phenotype drug sensitivity rates were found in those with the mutation of *AhpC* promoter region (-44-30 and -15-3) of isoniazid, the *rpoB* 507-512 of rifampin, the *rrs* 905-908 of streptomycin and the *embB* 406 of ethambutol, and the rates were 1/5, 1/5, 1/10 and 1/5, respectively. However, the phenotype drug sensitivity rates were higher in the isolates with mutation of the *KatG* 315 of isoniazid, the *rpoB* 529-533 of rifampin and the *rpsL* 43 of streptomycin, the rates were 92.42% (61/66), 92.31% (36/39) and 95.74% (45/47), respectively. **Conclusion** It has showed a good consistency in detection of drug resistance of MTB by fluorescence PCR probe melting curve and MicroDST. The drug resistance of MTB to isoniazid, rifampin and streptomycin was correlated with some gene mutations.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Polymerase chain reaction; Molecular probe techniques; Drug resistance, bacterial; Comparative Study

近几年,我国结核病的发病率逐年下降,但是耐药结核病患者逐年增多,且治疗难度大,医疗费用高,给结核病的防控带来了巨大的挑战。快速而准确地掌握患者的耐药情况是治疗和控制耐药结核传播的重要手段。目前,表型药物敏感性试验(简称“表型药敏试验”)仍是诊断结核分枝杆菌(MTB)耐药性的主要方法,但是表型药敏试验必须使用培养后分离的菌株,而且受到培养基上 MTB 生长速度的限制,一般需要 28~42 d 才能获得样品相关耐药性的结果。这使得患者不能及时得到有针对性的治疗,还增加了耐药 MTB 传播的风险。分子生物学检测方法能够快速检测 MTB 的耐药性,但检测的准确性尚需大量临床数据来验证。微孔板法[最低抑菌浓度(MIC)法]是在液体培养基基础上建立的一种表型药敏试验方法,与传统的固体药敏试验相比能提供更详细的耐药信息,且大大缩短了试验周期^[1-2]。笔者通过分析荧光 PCR 探针熔解曲线法和微孔板法检测 MTB 耐药性的一致性,研究 MTB 基因突变和 MIC 的关系,并探讨这两种方法在临床中的应用价值。

资料和方法

一、研究对象

搜集 2019 年 1—12 月分离自西安市胸科医院就诊患者并经鉴定确认的 343 株 MTB 临床分离株,患者标本包括痰液、肺泡灌洗液、胸腹腔积液、脓液、活体组织、脑脊液、引流液、尿液、胃液;菌株均进行了微孔板法药敏试验和荧光 PCR 探针熔解曲线法检测。

二、细菌培养及菌种鉴定

将合格的标本用 BACTEC MGIT 960 系统(美

国 BD 公司)进行分枝杆菌液体培养,对培养阳性的菌液进行萋-尼抗酸染色法涂片镜检,确认为分枝杆菌的液体培养标本用胶体金标记的 MPB64 蛋白单克隆抗体试剂(杭州创新生物检控技术有限公司)进行 MTB 快速抗原检测,鉴定为 MTB 的菌株纳入研究,并进行后续药敏试验。

三、微孔板法表型药敏试验

应用珠海银科医学工程股份有限公司生产的试剂盒(批号:2005041ZJSPJ)。在杂菌抑制剂中加入无菌稀释液,充分摇匀后取 100 μ l 加入药敏培养基并摇匀。在 96 孔板的 A1/E1 和 B1/F1 孔中加入 180 μ l 的药敏培养基,分别作为 1/10 和 1/100 的参照孔。在 C1/D1 或 G1/F1 孔加入 200 μ l 药敏培养基作为阴性对照孔。把培养阳性的待测菌株在 YK-50 多通道混匀器(珠海银科医学工程股份有限公司)中磨菌至比浊浓度 1 mg/ml,取 100 μ l 加入药敏培养基中,混匀后取 200 μ l 加入每一孔,其中阴性对照孔中不加,1/10 参照孔中加 20 μ l,从 1/10 孔中取 20 μ l 加入 1/100 参照孔。为了保证结果可靠,每批样品中除阴性对照外,另设 MTB 标准减毒株(H37Ra;菌株编号:ATCC25277,中国药品生物制品检定所)配制的阳性对照(A2/B2 或 E2/F2 孔)进行质量控制。本实验主要参考异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、莫西沙星和左氧氟沙星等 6 种抗结核药品的药敏试验结果。

将 96 孔药敏板密封好放入恒温培养箱中培养 7 d,观察结果(采用 YK-909TB 药敏阅读仪),孔底出现直径 2 mm 致密菌圈判断为阳性,生长欠佳者放入培养箱继续观察培养,在第 10、14、21 天时若有菌体沉淀则为阳性,培养 21 d 均无菌体沉淀者报告为阴性。

四、荧光 PCR 探针熔解曲线法

待测样品加入等量 4% 氢氧化钠溶液进行液化,之后经过 2 次离心(13 000×g, 5 min)及清洗,加入 50 μl 核酸提取液并充分涡旋,用 Ectractor TM 34 快速核酸提取仪(北京博奥生物有限公司)振荡,最后在 95 °C 金属浴中放置 5 min 再离心(13 000×g, 1 min)。将 2 μl 提取好的核酸加入扩增反应液,放入 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,扩增程序:37 °C、300 s(循环 1 次),94 °C、180 s(循环 1 次),94 °C、15 s(循环 40 次),60 °C、30 s(循环 40 次),50 °C、10 s(循环 1 次)。最后 FAM 通道的循环阈值(Ct 值) < 40 时判断为 MTB 阳性;如果 FAM 通道的 Ct 值 ≥ 40 则判断为 MTB 阴性;其中, FAM 通道的 Ct 值 ≥ 40, 且 HEX 通道 Ct 值 < 40 为非结核分枝杆菌(NTM), 阴性和 NTM 需要排除。Ct 值越低含菌量越高, FAM 通道的 Ct 值 < 30 时可以用剩余的核酸提取物进行荧光 PCR 探针熔解曲线法耐药检测。

分别将异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇,以及氟喹诺酮类药品耐药检测试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司,批号:20031801)平衡至室温溶解。将核酸提取物 5 μl 加入包含 PCR 混合液(包括引物、探针和脱氧核糖核苷三磷酸)和酶混合液(包括耐热 DNA 聚合酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶)的八联管中,放入实时荧光定量 PCR 检测系统(厦门致善生物科技股份有限公司)进行检测,阳性对照为含有相应野生型扩增靶基因的质粒。反应检测程序参照说明书。待测样品和阳性对照之间的熔解曲线熔点差异(T_m)如果 ≤ 1 °C 判断为野生型, T_m ≥ 2 °C 则判断为突变, T_m 值介于 1~2 °C 则为耐药性不明确。突变位点包括 6 种药品相关的 17 个位点。如果荧光 PCR 探针熔解曲线耐药检测中,同时检出了突变峰和野生峰,则报告耐药,同时备注为异质性耐药。

五、统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,以微孔板法药敏试验结果作为参照标准,评价荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对 4 种一线抗结核药品及 2 种氟喹诺酮类抗结核药品耐药的效能,计算公式:敏感度(%) = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阴性例数) × 100%; 特异度(%) = 真阴性例数 / (真阴性例数 + 假阳性例数) × 100%; 阳性预测值(%) = 真阳性例数 / (真阳性例数 + 假阳性例数) × 100%; 阴性预测值(%) = 真阴性例数 / (真阴

性例数 + 假阴性例数) × 100%; 约登指数 = 敏感度 + 特异度 - 1。阳性似然比 = 敏感度 / (1 - 特异度), 阴性似然比 = (1 - 敏感度) / 特异度。阳性似然比越大, 阴性似然比越小表示检测方法越准确。一致性用 Kappa 检验, Kappa 值 > 0.80 时认为一致性非常好, Kappa 值为 0.61~0.80 时认为一致性较好, Kappa 值为 0.41~0.60 时认为一致性一般, Kappa 值 < 0.41 时认为一致性较差。

结 果

一、耐药性检测

微孔板法检测 343 株 MTB 药敏试验结果显示,对 6 种抗结核药品敏感有 228 株(66.47%),对任一药品耐药有 115 株(33.53%);其中,耐多药有 43 株(12.54%)。荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 343 株 MTB 中,共 331 株 MTB 检出了明确耐药基因,其他 12 株有部分耐药基因的耐药性不明确,包括 10 株异烟肼耐药性不明确,1 株利福平耐药性不明确,1 株链霉素耐药性不明确,4 株乙胺丁醇耐药性不明确。213 株(64.35%)菌株对 6 种抗结核药品耐药基因检测均为野生型,118 株(35.65%)有 1 个或多个基因检测为突变型;其中,异烟肼和利福平耐药基因同时发生突变者有 53 株(16.01%)。

以微孔板法药敏试验结果为参照,荧光 PCR 探针熔解曲线法检测利福平、异烟肼、链霉素、莫西沙星和左氧氟沙星的敏感度和特异度均 > 91.00%,约登指数均 > 0.88, Kappa 值均 > 0.75;对 6 种药品耐药性检测阴性预测值均高于 98.00%,对左氧氟沙星耐药检测的阳性预测值最高,其次为异烟肼、链霉素、利福平和莫西沙星,对乙胺丁醇耐药性检测的阳性预测值最低(表 1)。

二、MTB 基因突变与表型药敏试验 MIC 的相关性

1. 异烟肼:荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的 343 株 MTB 中,有 10 株耐药性不明确。333 株检测结果有效的 MTB 中有 88 株(26.43%)发生突变,单一位点突变者占 94.32%(83/88)。单一位点突变率最高的是 *KatG315* 密码子(75.00%, 66/88),此位点发生突变的菌株表型药敏试验耐药率也最高(92.42%, 61/66),而且以 MIC 值为 1.6 μg/ml 的高浓度耐药为主。发生 *KatG315* 密码子突变的异质性耐药的 5 株 MTB 的表型药敏试验结果均为耐

药。未发现 *inhA94* 密码子单独突变的菌株。发生多位点突变的 5 株 MTB 表型药敏试验结果均为耐药,且均为高浓度耐药。5 株 MTB 发生 *AhpC* 启动子区(-44~-30 及 -15~3 位点)突变,4 株表型药敏试验结果为敏感,包括 1 株异质性耐药菌株(表 2)。

2. 利福平: 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的 343 株 MTB 中,1 株耐药性不明确。342 株检测结果有效的 MTB 中有 60 株(17.54%)发生突变,单一位点突变占 91.67%(55/60)。发生 *rpoB* 基因

529~533 位密码子突变的菌株最多(65.00%, 39/60),此位点发生突变的菌株表型药敏试验耐药率也最高(92.31%,36/39)。发生 *rpoB* 基因 507~512 位密码子突变的菌株表型药敏试验耐药率最低(1/5),而且在与 *rpoB* 基因 521~528 位密码子或 *rpoB* 基因 529~533 位密码子同时发生突变时,表型药敏试验结果也均为敏感。2 株 MTB 发生 *rpoB* 基因 513~520 位密码子突变,1 株表型药敏试验结果为耐药;另外 1 株异质性耐药菌株表型药敏试验结果为敏感(表 3)。

表 1 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对六种抗结核药品耐药性的效能

荧光 PCR 探针 熔解曲线法	微孔板法药敏试验		敏感度[% (95%CI)]	特异度[% (95%CI)]	阳性预测值 [%,(95%CI)]	阴性预测值 [%,(95%CI)]	阳性 似然比	阴性 似然比	约登 指数	Kappa 值
	耐药(株)	敏感(株)								
异烟肼			96.20 (88.55~ 99.01)	95.28 (91.68~ 97.42)	86.36 (77.00~ 92.45)	98.78 (96.17~ 99.68)	20.36	0.04	0.91	0.88
耐药	76	12								
敏感	3	242								
利福平			93.62 (81.44~ 98.34)	94.58 (91.17~ 96.76)	73.33 (60.11~ 83.55)	98.94 (96.66~ 99.72)	17.26	0.07	0.88	0.79
耐药	44	16								
敏感	3	279								
链霉素			96.88 (88.19~ 99.46)	94.96 (91.51~ 97.11)	81.58 (70.69~ 89.21)	99.25 (97.02~ 99.87)	19.24	0.03	0.92	0.86
耐药	62	14								
敏感	2	264								
乙胺丁醇			93.33 (66.03~ 99.65)	95.37 (92.32~ 97.29)	48.28 (29.89~ 67.10)	99.68 (97.93~ 99.98)	20.16	0.07	0.89	0.61
耐药	14	15								
敏感	1	309								
莫西沙星			92.31 (73.40~ 98.66)	97.16 (94.49~ 98.61)	72.73 (54.21~ 86.06)	99.35 (97.43~ 99.98)	32.51	0.08	0.89	0.80
耐药	24	9								
敏感	2	308								
左氧氟沙星			91.18 (75.19~ 97.69)	99.35 (97.42~ 99.98)	93.94 (78.38~ 98.94)	99.03 (96.96~ 99.75)	140.87	0.09	0.91	0.92
耐药	31	2								
敏感	3	307								

注 此表仅统计了耐药性明确的菌株情况;MTB:结核分枝杆菌

表 2 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对异烟肼耐药基因突变与表型药敏试验 MIC 值相关性

突变位点	表型药敏试验 MIC 分级计数(株)					耐药率 (%)
	<0.2 μg/ml (敏感)	0.2 μg/ml (耐药)	0.4 μg/ml (耐药)	0.8 μg/ml (耐药)	1.6 μg/ml (耐药)	
单一位点突变						
<i>AhpC</i> 启动子区(-44~-30 及-15~3 位点)	4	0	0	0	1	1/5
<i>inhA94</i> 密码子	0	0	0	0	0	0.00
<i>inhA</i> 启动子区(-17~-8 位点)	3	1	1	5	2	75.00
<i>KatG315</i> 密码子	5	0	0	6	55	92.42
多位点突变						
<i>inhA94</i> 密码子和 <i>inhA</i> 启动子区(-17~-8 位点)	0	0	0	0	1	1/1
<i>inhA94</i> 密码子和 <i>KatG315</i> 密码子	0	0	0	0	2	2/2
<i>inhA</i> 启动子区(-17~-8 位点)和 <i>KatG315</i> 密码子	0	0	0	0	2	2/2
未检测到突变	242	1	0	1	1	1.22

注 MTB:结核分枝杆菌;MIC:最低抑菌浓度

表 3 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对利福平耐药基因突变与表型药敏试验 MIC 值相关性

突变位点	表型药敏试验 MIC 分级计数(株)					耐药率 (%)
	<1 μg/ml (敏感)	1 μg/ml (敏感)	2 μg/ml (敏感)	4 μg/ml (中度敏感)	8 μg/ml (耐药)	
单一位点突变						
<i>rpoB</i> 基因 507~512 位密码子	4	0	0	0	1	1/5
<i>rpoB</i> 基因 513~520 位密码子	1	0	0	0	1	1/2
<i>rpoB</i> 基因 521~528 位密码子	3	1	0	1	4	4/9
<i>rpoB</i> 基因 529~533 位密码子	2	0	1	0	36	92.31
多位点突变						
<i>rpoB</i> 基因 507~512 和 521~528 位密码子	0	0	1	0	0	0.00
<i>rpoB</i> 基因 507~512 和 529~533 位密码子	1	0	0	0	0	0.00
<i>rpoB</i> 基因 513~520 和 521~528 位密码子	1	0	0	0	2	2/3
未检测到突变	278	1	0	0	3	1.06

注 MTB:结核分枝杆菌;MIC:最低抑菌浓度

3. 链霉素:荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的 343 株 MTB 中,1 株耐药性不明确。342 株检测结果有效的 MTB 中有 76 株(22.22%)发生突变,单一位点突变占 98.68%(75/76)。发生 *rpsL* 基因 43 位密码子突变的菌株最多(61.84%,47/76);8 株发生 *rpsL* 基因 88 位密码子突变的菌株表型药敏试验结果均为耐药。发生 *rrs* 基因 905~908 位点突变的菌株表型药敏试验耐药率最低(1/10),该位点有 5 株 MTB 为异质性耐药,其中 4 株表型药敏试验结果为敏感,1 株为耐药。发生 *rrs* 基因 513~

517 位点突变的菌株中有 1 株为异质性耐药,表型药敏试验结果为中度敏感(表 4)。

4. 乙胺丁醇:荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的 343 株 MTB 中,有 4 株耐药性不明确。339 株检测结果有效的菌株中有 29 株(8.55%)发生突变,均为单一位点突变。发生 *embB* 基因 306 位密码子突变的菌株比例最高(65.52%,19/29)。1 株 MTB 发生 *embB* 基因 378 位密码子突变,且表型药敏试验结果为敏感。发生 *embB* 基因 406 位密码子和 306 位密码子突变的菌株表型药敏试验耐药率也较低(表 5)。

表 4 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对链霉素耐药基因突变与表型药敏试验 MIC 值相关性

突变位点	表型药敏试验 MIC 分级计数(株)					耐药率 (%)
	<1 μg/ml (敏感)	1 μg/ml (敏感)	2 μg/ml (敏感)	4 μg/ml (中度敏感)	8 μg/ml (耐药)	
单一位点突变						
<i>rpsL</i> 基因 43 位密码子	2	0	0	0	45	95.74
<i>rpsL</i> 基因 88 位密码子	0	0	0	0	8	8/8
<i>rrs</i> 基因 513~517 位点	1	0	0	2	7	7/10
<i>rrs</i> 基因 905~908 位点	8	0	1	0	1	1/10
多位点突变						
<i>rpsL</i> 基因 43 位密码子和 <i>rrs</i> 基因 905~908 位点	0	0	0	0	1	1/1
未检测到突变	259	1	4	0	2	0.75

MTB: 结核分枝杆菌; MIC: 最低抑菌浓度

表 5 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对乙胺丁醇耐药基因突变与表型药敏试验 MIC 值相关性

突变位点	表型药敏试验 MIC 分级计数(株)					耐药率 (%)
	<2.5 μg/ml (敏感)	2.5 μg/ml (中度敏感)	5 μg/ml (耐药)	10 μg/ml (耐药)	20 μg/ml (耐药)	
<i>embB</i> 基因 306 位密码子	7	2	8	2	0	52.63
<i>embB</i> 基因 378 位密码子	1	0	0	0	0	0.00
<i>embB</i> 基因 406 位密码子	3	1	1	0	0	1/5
<i>embB</i> 基因 497 位密码子	1	0	3	0	0	3/4
未检测到突变	309	0	0	0	1	0.32

5. 氟喹诺酮类药品: 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的 343 株 MTB 中, 33 株(9.62%) 发生 *gyrA* 基因 88~94 位密码子突变。表型药敏试验结果显示, 31 株(93.94%, 31/33) 对左氧氟沙星耐药(MIC 为 8 μg/ml), 24 株(72.73%, 24/33) 对莫西沙星耐药(MIC 为 2 μg/ml)。荧光 PCR 探针熔解曲线检测到 2 株菌株为异质性耐药, 表型药敏试验均对莫西沙星敏感; 1 株对左氧氟沙星耐药, 1 株敏感。

讨 论

本研究显示, 以表型药敏试验结果为参考, 荧光 PCR 探针熔解曲线法对 6 种抗结核药品耐药性检测的敏感度和特异度均高于 90%。除乙胺丁醇外, 异烟肼、链霉素、左氧氟沙星、利福平、乙胺丁醇、莫西沙星的 *Kappa* 值均 ≥ 0.75, 说明这两种检测方法的约登指数均 ≥ 0.88, 说明荧光 PCR 探针熔解曲线法的真实性较好。此外, 荧光 PCR 探针熔解曲线法可以直接对多种类型的临床标本直接检测, 操作简便,

检测时间比表型药敏试验大大缩短, 还对同时含有敏感菌和耐药菌的复合菌群具有良好的分辨能力^[3-4]。所以, 基于分子生物学的快速耐药基因检测方法可以为结核病, 尤其是耐药结核病的早诊断和早治疗提供有力的支持。

本研究结果显示, 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对一线抗结核药品的敏感度均较高, 显示该方法对这 4 种药品的 MTB 耐药相关基因位点覆盖率较高; 且表型药敏试验耐药的菌株中大部分与所检测的位点突变有相关性, 这与许多研究一致^[5]。荧光 PCR 探针熔解曲线法检测 MTB 对氟喹诺酮类药品耐药性的敏感度较低, 尤其是检测 MTB 对左氧氟沙星耐药的敏感度仅为 91.18%, 虽然在可接受范围内, 但是仍低于 Chakravorty 等^[6]和张志国等^[7]研究结果, 原因可能是荧光 PCR 探针熔解曲线法只覆盖了 *gyrA* 基因但未检测 *gyrB* 基因。另外, 本研究显示, 莫西沙星和左氧氟沙星的阳性预测值有明显的差异, 提示 MTB 对这 2 种药品的相关耐药基因可能不完全相同, 尤其是莫西沙星可能存

在其他机制来杀灭 MTB。

本次研究发现,约 50% 的经荧光 PCR 探针熔解曲线检测为异质性耐药的菌株,其表型药敏试验结果为敏感。这可能是样品中耐药菌株比例较低引起的,也提示异质性耐药会导致 2 种检测方法结果出现不一致。在实际检测过程中要重视因异质性耐药引起的假阳性情况,尤其注意 MTB 耐链霉素的 *rrs* 基因 905~908 位点的突变。本研究通过对荧光 PCR 探针熔解曲线法和微孔板法表型药敏试验的比较,了解到荧光 PCR 探针熔解曲线法可以快速获取患者的耐药情况,尤其是未检测到基因突变时,可以使用一线抗结核药品方案。但是荧光 PCR 探针熔解曲线法对耐药 MTB 的预测效率较低,如果检测到突变基因,但表型药敏试验结果不一定会耐药,或者有可能只是高浓度敏感,尤其是 *AhpC* 启动子区(-44~-30 和 -15~3 位点),*rpoB* 507~512 位点和 *embB*406 位点突变时,最好等待表型药敏试验结果后,再考虑更换药物治疗方案。

MIC 分析结果显示,很多 MTB 基因突变也会导致其对抗结核药品高浓度敏感及中度敏感的状况。例如,*rpoB* 521~528 和 529~533 位点、*rrs* 513~517 和 905~908 位点、*embB* 306 和 406 位点,以及 *gyrA* 88~94 位点的突变均会出现较大概率的结果。另外,本研究中,出现 *AhpC* 启动子区(-44~-30 及 -15~3 位点)、*rpoB* 507~512 位点、*rrs* 905~908 位点、*embB* 378 位点等突变的菌株表型药敏试验结果多为敏感,可能与基因表达不足有关^[5,8],具体的机制还需要进一步研究。

综上所述,荧光 PCR 探针熔解曲线法可以利用患者临床标本快速检测抗结核药品的耐药性,且方便快捷,但对部分耐药靶点检测结果与表型药敏试验结果存在不一致,且其能够检测的基因位点有限。因此,可以将两种检测方法综合运用于结核病诊疗中,优势互补。对于普通初治患者和曾经敏感的复

治患者,早期可以用荧光 PCR 探针熔解曲线法检测的阴性结果排除耐药,待表型药敏试验结果明确后再进行调整治疗方案。对于荧光 PCR 探针熔解曲线法检测显示为突变的患者,为了避免假阳性结果带来的误导,最好等待表型药敏试验结果复核。对于治疗效果不好的初治患者和曾经耐药的复治患者则可以根据荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结果先进行经验性治疗,再根据表型药敏试验结果调整方案。

参 考 文 献

- [1] 李静,梁亚萍,王卓,等. 微孔板法与 GeneXpert MTB/RIF 技术检测结核分枝杆菌对利福平耐药性的价值. 中国防痨杂志, 2019, 41(2): 162-168. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.02.008.
- [2] 曾熙玲,初乃惠,刘志敏. 耐药结核病辅助治疗的进展. 结核病与肺部健康杂志, 2013, 2(4): 222-227. doi:10.3969/j.issn.2095-3755.2013.04.002.
- [3] 赵国连,崔晓利,康磊,等. 荧光 PCR 探针熔解曲线技术检测涂阳患者痰标本中结核分枝杆菌耐药性的价值. 中国防痨杂志, 2019, 41(2): 149-155. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.02.006.
- [4] 马晓光,李辉,石洁,等. 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌耐异烟肼突变. 现代预防医学, 2013, 40(22): 4201-4204,4027.
- [5] Palomino JC, Martin A. Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2014, 3(3): 317-340. doi:10.3390/antibiotics3030317.
- [6] Chakravorty S, Aladegbami B, Thoms K, et al. Rapid detection of fluoroquinolone-resistant and heteroresistant *Mycobacterium tuberculosis* by use of sloppy molecular beacons and dual melting-temperature codes in a real-time PCR assay. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 932-940. doi:10.1128/JCM.02271-10.
- [7] 张治国,杜春英,张倩,等. 我国结核分枝杆菌 *gyrA* 不同突变类型对氟喹诺酮类药物耐药水平的相关性研究. 中国防痨杂志, 2016, 38(9): 706-711. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.09.003.
- [8] Bergval IL, Schuitema ARJ, Klatser PR, et al. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected *in vitro* do not reflect the *in vivo* mechanism of isoniazid resistance. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(3): 515-523. doi:10.1093/jac/dkp237.

(收稿日期:2020-06-30)

(本文编辑:李敬文)