

· 临床研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.16.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240617.0935.004\(2024-06-18\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240617.0935.004(2024-06-18))

荧光 PCR 熔解曲线法检测结核分枝杆菌对氟喹诺酮类耐药性的临床研究*

秦娅莉¹, 陈静^{1,2Δ}, 李军¹, 王明栋², 欧维正², 邱继瑶², 彭燕清²

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 561113;

2. 贵阳市公共卫生救治中心, 贵阳 550001)

[摘要] **目的** 评估荧光 PCR 熔解曲线法早期诊断结核病患者对氟喹诺酮类(FQs)耐药性的效能, 分析 FQs 耐药情况及特征, 为利福平耐药/耐多药结核病(RR/MDR-TB)、准广泛耐药结核病(pre-XDR-TB)规范诊断和选择合理治疗方案提供依据。**方法** 收集 2021 年 1 月至 2022 年 8 月贵阳市公共卫生救治中心 1 094 例门诊和住院患者涂片阳性标本, 行罗氏固体培养法、菌种鉴定, 最终 589 例结核病患者均进行表型药敏试验与荧光 PCR 熔解曲线法, 对利福平(RFP)、异烟肼(INH)、乙胺丁醇(EMB)、FQs 耐药性进行检测; 以表型药敏试验为标准, 评估荧光 PCR 熔解曲线法的诊断效能, 根据表型药敏试验结果分析患者 FQs 耐药情况和临床特征的关系。**结果** 荧光 PCR 熔解曲线法检测结核病患者对 FQs 耐药性的灵敏度、特异度、符合率、Kappa 值分别为 91.30%、97.69%、96.94%、0.86, 曲线下面积(AUC)为 0.945, 高于 RFP、INH、EMB 的 0.924、0.923、0.850。RR/MDR-TB 患者中 FQs 耐药率为 22.80%, 荧光 PCR 熔解曲线法检测患者对 FQs 耐药性的 Kappa 值为 0.83, 一致性较好, AUC 为 0.936。荧光 PCR 熔解曲线法检测不同细菌载量结核病患者对 FQs 耐药性的灵敏度、特异度、符合率差异均无统计学意义($P > 0.05$)。治疗类型、抗结核史、肺部空洞、MDR-TB 与 FQs 耐药有关($P < 0.05$)。**结论** 荧光 PCR 熔解曲线法对结核病患者 FQs 耐药性有较好的诊断效能。

[关键词] 耐多药结核病; 耐药性; 荧光 PCR 熔解曲线法; 氟喹诺酮类; 准广泛耐药结核病

[中图分类号] R521 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)16-2414-07

Clinical study on fluoroquinolones resistance of *Mycobacterium tuberculosis* detected by fluorescence PCR melting curve method*

QIN Yali¹, CHEN Jing^{1,2Δ}, LI Jun¹, WANG Mingdong², OU Weizheng², QIU Jiyao², PENG Yanqing²

(1. Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control of

Ministry of Education, School of Public Health, Guizhou Medical University,

Guiyang, Guizhou 561113, China; 2. Guiyang Municipal Public

Health Treatment Center, Guiyang, Guizhou 550001, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the efficiency of fluorescent PCR melting curve method in early diagnosis of fluoroquinolones (FQs) resistance in the patients with tuberculosis, and to analyze the situation and characteristics of FQs resistance, so as to provide a basis for the standardized diagnosis and treatment of rifampicin resistance/multidrug resistant tuberculosis (RR/MDR-TB) and pre-extensively drug resistant tuberculosis (pre-XDR-TB). **Methods** A total of 1 094 smear positive samples from the outpatients and inpatients of Guiyang Municipal Public Health Treatment Center from January 2021 to August 2022 were collected and conducted the Roche solid culture method and bacterial species identification. Finally, 589 cases of tuberculosis conducted the phenotypic drug sensitivity test and fluorescent PCR melting curve method for detecting rifampicin (RFP), isoniazid (INH), ethambutol (EMB) and FQs resistance. The phenotypic drug sensitivity test served as the standard to evaluate the diagnostic efficiency of the fluorescent PCR melting curve method; the relationship between the patients' FQs resistance and clinical characteristics was analyzed according to the phenotypic drug sensitivity results. **Results** The sensitivity, specificity, coincidence rate and Kappa value of

* 基金项目:“十三五”国家重大新药创制项目(2017ZX09304009)。Δ 通信作者, E-mail: chenjingfk@sina.cn.

fluorescence PCR melting curve method for detecting FQs drug resistance were 91.30%, 97.69%, 96.94% and 0.86 respectively; the area under the curve (AUC) was 0.945, which was higher than 0.924, 0.923 and 0.850 of RFP, INH and EMB. The drug resistance rate of FQs in the patients with RR/MDR-TB was 22.80%, the Kappa value of fluorescence PCR melting curve method for detecting the patients' FQs drug resistance was 0.83, the consistency was good, AUC was 0.936. There was no statistically significant difference in sensitivity, specificity and coincidence rate of FQs resistance in TB patients with different bacterial loads by fluorescence PCR fusion curve ($P > 0.05$). The treatment type, history of anti-tuberculosis, pulmonary cavity and MDR-TB were related with FQs resistance ($P < 0.05$). **Conclusion** The fluorescent PCR melting curve method has good diagnostic efficiency for FQs resistance in the patients with tuberculosis.

[Key words] mycobacterium tuberculosis; drug resistance; fluorescence PCR melting curve method; fluoroquinolones; pre-extensively drug resistant tuberculosis

据 2023 年 WHO 报告, 全球新发结核病患者 1 060 万例, 其中我国新发患者数为 78.0 万例, 在 30 个结核病高负担国家中排第 3 位; 耐药结核病负担也增加了 3%, 这是近年来首次报告结核病患者数和耐药结核病患者数均增加^[1]。利福平耐药/耐多药结核病 (RR/MDR-TB)、准广泛耐药结核病 (pre-XDR-TB) 和广泛耐药结核病 (XDR-TB) 因治疗困难、治愈率低及传染性强, 已引起了社会广泛关注^[2]。氟喹诺酮类 (FQs) 是治疗 RR/MDR-TB 的首选核心药物, 其主要抑制结核分枝杆菌 (MTB) 的 DNA 解旋酶 A 亚单位, 阻止 DNA 复制与转录, 达到杀灭 MTB 的作用^[3-4]。FQs 作为新一代广谱抗生素, 除用于 MTB 感染治疗外, 对革兰氏阳性菌、阴性菌也有抗菌作用, 抗菌作用强, 范围广^[5]。因 FQs 被广泛用于临床抗感染治疗, 导致 FQs 耐药形势十分严峻。据统计, 全球结核病患者 FQs 耐药率为 1%~2%, 而我国则高达 20%^[1], 导致 RR/MDR-TB 的治疗难度增加。因此, 寻找一种快速获得 RR/MDR-TB 中 FQs 耐药信息的新技术用于早期识别 pre-XDR-TB 尤为重要。

目前耐药结核病的诊断主要依靠传统表型药敏试验和基因型检测。表型药敏试验需要 6~8 周才能得到结果^[6]; 基因型检测主要包括基因芯片技术和结核分枝杆菌及利福平耐药快速检测技术 (Xpert MTB/RIF), 虽然快速简便, 但基因芯片技术只能检测利福平 (RFP) 和异烟肼 (INH) 的耐药性, Xpert MTB/RIF 只能检测 RFP 的耐药性^[7-8]。荧光 PCR 熔解曲线法除可检测 MTB 对 RFP、INH 的耐药性外, 还可检测其对链霉素 (SM)、吡嗪酰胺 (PZA)、乙胺丁醇 (EMB)、FQs 的耐药性^[9]。该技术可检测 MTB *gyrA* 基因扩增, 并设计特异探针检测 FQs 耐药决定区 *gyrA* 基因 88~94 密码子, 并在 2~3 h 得出耐药信息。鉴于该方法尚未在贵州省开展临床应用评估, 且对 FQs 耐药性检测及在 RR/MDR-TB 患者中的检测评估相关研究数据匮乏。本研究旨在评估

荧光 PCR 熔解曲线法早期诊断结核病患者对 FQs 耐药性的效能, 分析 FQs 耐药情况与临床特征的关系, 为耐药结核病规范诊断和选择合理治疗方案提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性收集 2021 年 1 月至 2022 年 8 月贵阳市公共卫生救治中心 1 094 例门诊和住院患者的涂片阳性标本, 接受荧光 PCR 熔解曲线法 (MeltPro® TB 系统) 检测的有 720 例, 通过样本量估计及纳入排除标准, 最终共纳入 589 例患者。其中男 397 例, 女 192 例, 年龄 9~89 岁, 平均 (48.59±17.84) 岁; 初治患者 300 例, 复治患者 289 例; 痰液标本 569 份, 肺泡灌洗液标本 15 份, 尿液标本 2 份, 粪便标本 3 份。纳入标准: (1) 经临床确诊为结核病; (2) 均进行表型药敏试验与荧光 PCR 熔解曲线法检测 RFP、INH、EMB、FQs 的耐药性。排除标准: (1) 经菌种鉴定为非 MTB; (2) 检测结果不确定; (3) 罗氏固体培养阴性, 无表型药敏试验结果; (4) 临床资料不完整。从病历系统收集患者一般人口学资料、临床资料、影像学资料等。本研究已通过贵阳市公共卫生救治中心医学伦理委员会批准 (审批号: 22020322)。

1.2 样本量的估计

依据公式^[10]计算所需最低样本量:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times S_N \times (1 - S_N)}{L^2 \times prevalence} \quad (1)$$

S_N 为预期灵敏度, 通过回顾文献^[11], S_N 取 85%; L 为容许误差, 通常取 0.1; α 取 0.05 时 $Z_{1-\alpha/2}^2$ 取 1.96; $prevalence$ 为 FQs 耐药率, 查阅相关文献^[12], 耐药率按 10% 计算。考虑 10% 脱落率, 约需 539 例, 最终样本量为 589 例。

1.3 方法

1.3.1 主要仪器及试剂

Lab-Aid 824s 核酸提取仪 (厦门致善生物科技股

份有限公司), MTB 耐药突变检测试剂盒(厦门致善生物科技股份有限公司), SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统(上海宏石医疗科技有限公司), YK-96 小型全自动移液平台(珠海银科医学工程股份有限公司), 微孔板药敏检测试剂盒(珠海银科医学工程股份有限公司), BACspreadTM1100c 细菌超声分散计数仪(广东希格生物科技有限公司)。

1.3.2 表型药敏试验

临床标本经罗氏固体培养, 培养阳性标本经对硝基苯甲酸(PNB)生长实验进行 MTB 菌种鉴定, 应用分枝杆菌微孔板药敏检测试剂盒(珠海银科医学工程股份有限公司)测定患者对 RFP、INH、EMB、左氧氟沙星(Lfx)、莫西沙星(Mfx)的耐药性, 操作严格按照《结核病实验室检验规程》^[13] 执行。

1.3.3 荧光 PCR 熔解曲线法

MeltPro[®] TB 耐药一体化检测系统对 RFP、INH、EMB、FQs 的耐药性检测。(1)按照试剂盒说明书进行样品的采集及制备。(2)核酸提取: 将液化后的标本取 1 mL, 10 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液并在 250 μ L TB DNA 提取液中重悬沉淀; 封口膜封口, 99 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 再利用 Lab-Aid 824s 核酸提取仪进行核酸提取。(3)严格按照试剂盒说明书操作步骤对 MTB 临床分离株进行检测, INH 耐药决定区为 *ahpC* 基因启动子区(-44~-30 位点及-15~-3 位点)、*inhA* 基因第 94 位密码子、*inhA* 基因启动子区(-17~-8 位点)及 *katG* 基因第 315 位密码子, RFP 耐药决定区为 *rpoB* 基因第 507~533 位密码子, EMB 耐药决定区为 *embB* 基因第 306、368/378/380、406 和 497 位密码子, FQs 耐药决定区为 *gyrA* 基因第 88~94 位密码子, 通过检测突变与否确定耐药信息, 结果依据试剂盒说明书判读。

1.3.4 耐药结核病相关定义

利福平耐药结核病(RR-TB): 结核病患者感染的 MTB 经体外表型药敏试验证实对 FQs 耐药; 耐多药结核病(MDR-TB): 结核病患者感染的 MTB 经体外 DST 被证实至少对 INH 和 FQs 耐药; pre-XDR-TB: 在 RR/MDR-TB 基础上同时对任意 FQs(包括 Lfx、Mfx)耐药; XDR-TB: 在 RR/MDR-TB 基础上同时对任意 FQs 及至少 1 种 A 组药物(贝达喹啉、利奈唑胺)耐药。

1.4 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行统计学分析。计数资料以例数或百分比表示, 采用 χ^2 检验。以表型药敏试验为标准, 计算荧光 PCR 熔解曲线法的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、符合率, 采用 Kappa 值反映一致性水平, ≥ 0.75 为一致性较好, $0.40 \sim < 0.75$ 为一致性一般, < 0.4 为一致性较差, 绘制受试

者工作特征(ROC)曲线下面积(AUC)评估诊断效能。检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法检测结核病患者 RFP、INH、EMB、FQs 耐药率

表型药敏试验显示: RFP 总体耐药率为 32.77% (193/589), INH 总体耐药率为 36.67% (216/589), EMB 总体耐药率为 13.41% (79/589), FQs 总体耐药率为 11.71% (69/589)。荧光 PCR 熔解曲线法显示: RFP 总体耐药率为 39.39% (232/589), INH 总体耐药率为 35.31% (208/589), EMB 总体耐药率为 20.37% (120/589), FQs 总体耐药率为 12.73% (75/589), 见表 1。

表 1 两种方法检测结核病患者 RFP、INH、EMB、FQs 的耐药率 ($n = 589$)

项目	表型药敏试验		荧光 PCR 熔解曲线法	
	耐药数(n)	耐药率(%)	耐药数(n)	耐药率(%)
RFP _{总体}	193	32.77	232	39.39
INH _{总体}	216	36.67	208	35.31
EMB _{总体}	79	13.41	120	20.37
FQs _{总体}	69	11.71	75	12.73
RFP+INH	77	13.07	65	11.04
INH+FQs	4	0.68	1	0.17
RFP+INH+FQs	15	2.55	11	1.87
INH+EMB+FQs	1	0.17	2	0.34
RFP+INH+EMB+FQs	29	4.92	35	5.94

2.2 荧光 PCR 熔解曲线法对结核病患者 RFP、INH、EMB、FQs 耐药性的诊断效能分析

两种方法检测结核病患者对 RFP、INH、EMB、FQs 耐药性的 Kappa 值分别为 0.81、0.85、0.57、0.86, 检测 RFP、INH、FQs 一致性较好, 见表 2。ROC 曲线分析显示, 荧光 PCR 熔解曲线法检测结核病患者对 RFP、INH、EMB、FQs 耐药性的曲线下面积(AUC)分别为 0.924、0.923、0.850、0.945, FQs 的 AUC 高于 RFP、INH、EMB, 见图 1。

2.3 荧光 PCR 熔解曲线法对 RR/MDR-TB 患者 FQs 耐药性的诊断效能分析

589 例结核病患者中 RR/MDR-TB 为 193 例, FQs 在 RR/MDR-TB 患者中的耐药率为 22.80% (44/193)。以表型药敏试验为标准, 荧光 PCR 熔解曲线法检测 RR/MDR-TB 患者对 FQs 耐药性的灵敏度、特异度、符合率分别为 93.18%、93.96%、93.78%, Kappa 值为 0.83, 一致性较好, AUC 为

0.936, 见表 3。

2.4 两种方法检测不同细菌载量结核病患者对 FQs 的耐药性及其诊断效能

细菌载量从 +~4+, 荧光 PCR 熔解曲线法检测结核病患者对 FQs 耐药性的灵敏度分别为 100.00%、100.00%、93.75%、93.10%、70.00%, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 7.289, P > 0.05$); 特异度分别为 98.08%、98.10%、97.58%、98.28%、95.38%, 差

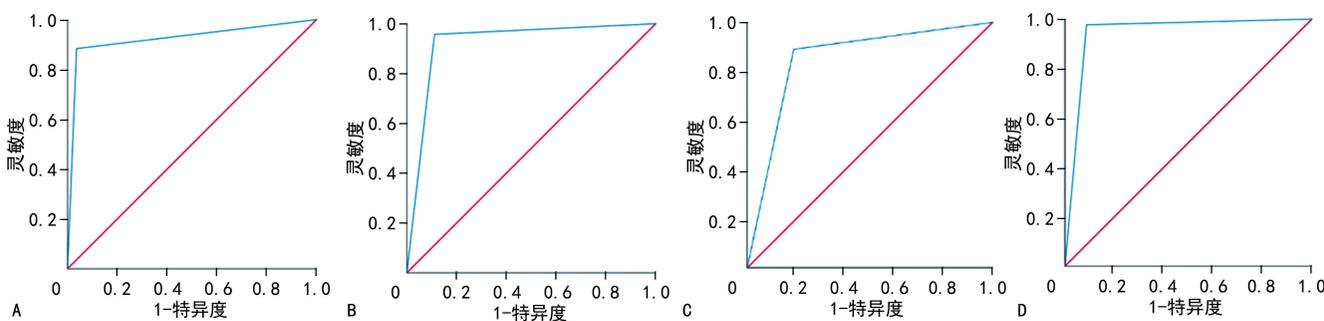
异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.849, P > 0.05$); 符合率分别为 98.25%、98.25%、97.14%、97.54%、92.00%, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 7.425, P < 0.05$); Kappa 值分别为 0.90、0.89、0.87、0.90、0.65, 见表 4。

2.5 不同临床特征结核病患者对 FQs 耐药性分析

589 例结核病患者按照表型药敏试验结果分为 FQs 敏感和 FQs 耐药, 治疗类型、抗结核史、肺部空洞、MDR-TB 与 FQs 耐药有关 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 2 荧光 PCR 熔解曲线法对结核病患者 RFP、INH、EMB、FQs 耐药性的诊断效能

荧光 PCR 熔解曲线法	表型药敏试验			灵敏度 [% (n/n)]	特异度 [% (n/n)]	阳性预测值 [% (n/n)]	阴性预测值 [% (n/n)]	符合率 [% (n/n)]	Kappa 值	AUC
	耐药	敏感	合计							
RFP				96.37(186/193)	88.38(350/396)	80.17(186/232)	98.04(350/357)	91.00(536/589)	0.81	0.924
耐药	186	46	232							
敏感	7	350	357							
合计	193	396	589							
INH				88.89(192/216)	95.71(357/373)	92.31(192/208)	93.70(357/381)	93.21(549/589)	0.85	0.923
耐药	192	16	208							
敏感	24	357	381							
合计	216	373	589							
EMB				81.01(64/79)	89.02(454/510)	53.33(64/120)	96.80(454/469)	87.95(518/589)	0.57	0.850
耐药	64	56	120							
敏感	15	454	469							
合计	79	510	589							
FQs				91.30(63/69)	97.69(508/520)	84.00(63/75)	98.83(508/514)	96.94(571/589)	0.86	0.945
耐药	63	12	75							
敏感	6	508	514							
合计	69	520	589							



A: RFP; B: INH; C: EMB; D: FQs。

图 1 ROC 曲线分析

表 3 荧光 PCR 熔解曲线法对 RR/MDR-TB 患者 FQs 耐药性的诊断效能

荧光 PCR 熔解曲线法	表型药敏试验			灵敏度 [% (n/n)]	特异度 [% (n/n)]	阳性预测值 [% (n/n)]	阴性预测值 [% (n/n)]	符合率 [% (n/n)]	Kappa 值	AUC
	耐药	敏感	合计							
耐药	41	9	50							
敏感	3	140	143	93.18(41/44)	93.96(140/149)	82.00(41/50)	97.90(140/143)	93.78(181/193)	0.83	0.936
合计	44	149	193							

表 4 两种方法检测不同细菌载量结核病患者对 FQs 的耐药性

细菌载量	荧光 PCR 熔解曲线法	表型药敏试验			灵敏度 [%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	特异度 [%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	阳性预测值 [%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	阴性预测值 [%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	符合率 [%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	Kappa 值
		耐药	敏感	合计						
+	耐药	5	1	6	100.00(5/5)	98.08(51/52)	83.33(5/6)	100.00(51/51)	98.25(56/57)	0.90
	敏感	0	51	51						
	合计	5	52	57						
1+	耐药	9	2	11	100.00(9/9)	98.10(103/105)	81.82(9/11)	100.00(103/103)	98.25(112/114)	0.89
	敏感	0	103	103						
	合计	9	105	114						
2+	耐药	15	3	18	93.75(15/16)	97.58(121/124)	83.33(15/18)	99.18(121/122)	97.14(136/140)	0.87
	敏感	1	121	122						
	合计	16	124	140						
3+	耐药	27	3	30	93.10(27/29)	98.28(171/174)	90.00(27/30)	98.84(171/173)	97.54(198/203)	0.90
	敏感	2	171	173						
	合计	29	174	203						
4+	耐药	7	3	10	70.00(7/10)	95.38(62/65)	70.00(7/10)	95.38(62/65)	92.00(69/75)	0.65
	敏感	3	62	65						
	合计	10	65	75						

+:1~8 条 MTB/300 视野;1+:3~9 条 MTB/100 视野;2+:1~9 条 MTB/10 视野;3+:1~9 条 MTB/视野;4+:≥10 条 MTB/视野。

表 5 不同临床特征结核病患者对 FQs 耐药性分析

项目	FQs 耐药	FQs 敏感	χ^2	<i>P</i>	项目	FQs 耐药	FQs 敏感	χ^2	<i>P</i>
年龄			3.587	0.310	粉尘接触史			0.225	0.635
<18 岁	0	16			是	12	79		
18~40 岁	21	148			否	57	441		
>40~60 岁	32	206			抗结核史			10.031	0.007
>60 岁	16	150			有(规则)	20	140		
性别			0.464	0.496	有(不规则)	34	172		
男	49	348			无	15	208		
女	20	172			肺部空洞			7.238	0.007
治疗类型			17.120	<0.001	有	59	364		
初治	19	281			无	10	156		
复治	50	239			糖尿病			0.142	0.706
吸烟史			0.784	0.376	有	15	103		
有	40	272			无	54	417		
无	29	248			MDR-TB			48.454	<0.001
饮酒史			0.002	0.962	是	44	123		
有	29	217			否	25	397		
无	40	303							
结核接触史			1.346	0.246					
有	4	53							
无	65	467							

3 讨 论

耐药结核病是严峻的公共卫生问题^[1]。贵州是我国结核病和耐药结核病高发地区,贵阳市公共卫生救治中心作为贵州结核病和耐药结核病的定点医院,

首次将荧光 PCR 熔解曲线法引入。此前该技术在贵州临床应用研究数据匮乏,特别是对于 RR/MDR-TB 患者 FQs 耐药检测方法、耐药情况研究较少。因此,本研究主要探索该技术应用于 FQs 耐药性的诊断效

能,为早期发现、及时诊断、制订合理的治疗方案提供依据,以减少 XDR-TB 的发生和传播。

本研究显示,荧光 PCR 熔解曲线法检测结核病患者对 FQs 耐药性的灵敏度、特异度、符合率、Kappa 值分别为 91.30%、97.69%、96.94%、0.86, AUC 为 0.945,高于 RFP、INH、EMB 的 0.924、0.923、0.850。若结核病患者仅单耐 FQs,对一线抗结核药物均敏感,则在治疗上影响相对较小,本研究将荧光 PCR 熔解曲线法应用于 RR/MDR-TB 患者对 FQs 耐药性的诊断效能分析,发现灵敏度、特异度、符合率、Kappa 值、AUC 分别为 93.18%、93.96%、93.78%、0.83、0.936,与刘春平等^[14]、曹志华等^[15]研究结果基本一致,均高于史剑琴等^[16]研究结果。这可能是由于该研究分析的是 Lfx,而本研究将 Mfx 也纳入分析,荧光 PCR 熔解曲线法不能具体区分 Lfx 和 Mfx 耐药。总体上荧光 PCR 熔解曲线法对 FQs 耐药性的诊断效能较好,在临床中用于快速检测具有一定参考价值,对于合理选择 RR/MDR-TB 用药和早期识别 pre-XDR-TB 有一定的参考依据。

本研究两种方法检测结核病患者对 FQs 耐药不一致有 18 例,荧光 PCR 熔解曲线法耐药、表型药敏试验敏感 12 例(11 例为痰标本,1 例为粪便标本),荧光 PCR 熔解曲线法敏感、表型药敏试验耐药 6 例(均为痰标本)。可能的原因:(1)试剂盒存在局限性,本研究试剂盒检测 FQs 耐药决定区是 gyrA 基因第 88~94 位密码子,而有研究^[17-18]证明 FQs 耐药决定区包括 gyrB 基因;(2)耐药机制的复杂性,如药物外排泵的原因;(3)在同一标本中,可能存在既是耐药株又是敏感株的情况(低比例的异质性耐药)^[19];(4)可能与标本 MTB 菌株含量低有关;(5)可能与不同类型标本有关,有研究表明^[20]荧光 PCR 熔解曲线法在肺外标本中有较好的诊断效能,但不同标本引起的检测结果不一致的相关研究较少,本研究的肺外标本也较少,数据难以获得,未能进一步分析,此观点可待增加肺外标本量后进一步研究;(6)虽然传统表型药敏试验是目前药敏检测的金标准,但它要求严格的操作技术及无菌过程,还有抗结核药物临界浓度的复杂性,以致不能明确所检测的菌株为耐药或敏感,这也是两种方法检测结果不一致的原因之一,对临床医师选择治疗方案带来了一定的困扰。因此,当检测结果出现不一致时,可进一步进行基因测序,同时检测基因型和表型并结合临床判断其耐药性。

本研究显示,细菌载量从 10^4 ~ 10^7 的灵敏度、特异度、符合率均无差异,说明细菌载量对两种方法检测结果影响不大,可能是由于本研究基于 MTB 阳性标本进行检测,这些标本中细菌载量相对较高,当耐药菌株超过 1% 时,就能获得耐药信息^[21]。

本研究显示 FQs 总耐药率达 11.71%,与赵慧等^[22]研究结果接近,高于全球水平(1%~2%),且在

MDR-TB 基础上 FQs 耐药率高达 7.47%。贵州近年的一项研究^[23]也报道了 MDR-TB 基础上 FQs 耐药率为 5.26%,FQs 药物较高的耐药率应引起重视。本研究显示,FQs 耐药与年龄、性别、吸烟史、饮酒史、结核接触史、粉尘接触史、结核病患者伴有糖尿病等无关($P>0.05$)。有研究证实^[24-25],患者年龄、性别与 MTB 发生耐药有关,但未表明直接与 FQs 耐药有关。FQs 耐药和敏感在治疗类型、抗结核史、肺部空洞、MDR-TB 等上差异有统计学意义,复治和不规则抗结核的患者易发生 FQs 耐药,这与大多数研究结果一致^[22,24]。鉴于此,建议对于依从性不好的患者开始抗结核治疗时给予合理、规范用药宣教,警惕 FQs 耐药发生。本研究发现,CT 伴空洞与 FQs 耐药有关,国内外有研究^[26-27]提示 CT 伴空洞的患者与 pre-XDR-TB 和 XDR-TB 有关,可能 MTB 在体内大量繁殖,毒力强,患者免疫力低下,反复治疗导致耐药的形成。本研究表明,MDR-TB 患者更易引起 FQs 耐药,FQs 作为广谱抗生素,被广泛应用于临床抗感染治疗中,加剧了耐药的发生,另有研究^[24,28]也提示了 MDR-TB 患者对于 FQs 耐药不容乐观。因此,FQs 药敏监测、不同特征患者的药敏分析、选择合理的治疗方案至关重要。

本研究存在一定的局限性:(1)荧光 PCR 熔解曲线法不能具体区分 Lfx 和 Mfx 的耐药性,与表型药敏试验结果不一致时,可进行基因测序验证,或多种方法相结合、复检、结合临床判断其耐药性;(2)未将 FQs 用药史纳入分析,由于本研究为回顾性研究,系统中未记录 FQs 用药史,可在后续研究中改进措施及方法,更好地收集用药信息;(3)患者均来自同一医院,可能存在一定的地域耐药差异性 & 检测手段差异性。

综上所述,荧光 PCR 熔解曲线法与表型药敏试验比较,对于检测 FQs 耐药性具有较高一致性,在临床中有良好的应用价值。根据早期的 FQs 耐药信息,结合结核患者的临床特征分析,可为 RR/MDR-TB 患者优先选择 FQs 药物提供参考依据,有利于控制 pre-XDR-TB 和 XDR-TB 的发生和传播。

参考文献

- [1] BAGCCHI S. WHO's global tuberculosis report 2022[J]. Lancet Microbe, 2023, 4(1): e20.
- [2] NAHID P, MASE S R, MIGLIORI G B, et al. Treatment of drug-resistant tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(10): e93-142.
- [3] 初乃惠, 聂文娟. 耐药肺结核全口服化学治疗方案中国专家共识(2021 年版)[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(9): 859-866.

- [4] CHEN T C, LU P L, LIN C Y, et al. Fluoroquinolones are associated with delayed treatment and resistance in tuberculosis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Infect*, 2011, 15(3): e211-216.
- [5] 初乃惠, 周文强, 沙巍. 非结核分枝杆菌病治疗药品超说明书用法专家共识[J]. *中国防痨杂志*, 2020, 42(8): 769-787.
- [6] 刘春平, 熊德芳, 谭耀驹. 两种分子检测技术对结核分枝杆菌临床分离株耐药性诊断价值的评价[J]. *临床肺科杂志*, 2021, 26(6): 815-819.
- [7] GUO Y, ZHOU Y, WANG C, et al. Rapid accurate determination of multidrug resistance in *M. tuberculosis* isolates and sputum using a blochip system[J]. *Int J Tuberc Lung*, 2009, 13(7): 914-920.
- [8] DAVID J H, MIKASHMI K, JERRY S Z, et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults[J]. *Database Syst Rev*, 2019, 6(6): CD009593.
- [9] 李媛媛, 苏东栋. 荧光 PCR 熔解曲线法在结核分枝杆菌耐药基因检测中的应用[J]. *中国实用医药*, 2021, 16(9): 210-212.
- [10] MALHOTRA R K, INDRAYAN A. A simple nomogram for sample size for estimating sensitivity and specificity of medical tests[J]. *Indian J Ophthalmol*, 2010, 58(6): 519-522.
- [11] 孙雯娜, 张俊仙, 张秀爽, 等. 两种分子药物敏感性试验与表型药物敏感性试验检测结核分枝杆菌耐药性的效能比较[J]. *中国防痨杂志*, 2022, 44(10): 1016-1021.
- [12] 赵江南. 结核分枝杆菌对氟喹诺酮耐药现状及危险因素的回溯性临床分析[D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [13] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 174-277.
- [14] 刘春平, 谭耀驹, 苏碧仪, 等. 荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌对利福平、异烟肼、喹诺酮及卡那霉素耐药性的评价[J]. *广东医学*, 2021, 42(4): 377-381.
- [15] 曹志华, 赵悦竹, 胡双双. 荧光 PCR 探针熔解曲线技术检测结核分枝杆菌对五种抗结核药物耐药性的研究[J]. *中国防痨杂志*, 2019, 41(2): 156-161.
- [16] 史剑权, 高珊, 王隼. 荧光 PCR 熔解曲线法对抗结核药物异烟肼、乙胺丁醇、左氧氟沙星耐药性的诊断价值[J]. *中国医药导报*, 2022, 19(4): 37-40, 44.
- [17] XIE Y L, CHAKRAVORTY S, ARMSTRONG D T, et al. Evaluation of a rapid molecular drug-susceptibility test for tuberculosis[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(11): 1043-1054.
- [18] 孟繁荣, 杨瑜, 雷杰, 等. 中国氟喹诺酮耐药结核分枝杆菌 *gyr* 基因序列特征分析[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(11): 1503-1508.
- [19] WANG Z, SUN R, MU C, et al. Characterization of fluoroquinolone-resistant and multi-drug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates using whole-genome sequencing in Tianjin, China[J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 1793-1803.
- [20] 黄少君. 分子生物学诊断新方法在淋巴结核诊断中的应用研究[D]. 北京: 北京市结核病胸部肿瘤研究所, 2017.
- [21] 江丽娜, 王志锐, 高丽, 等. Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的准确性与结核病患者痰细菌载量的相关性: 一项天津市的回溯性研究[J]. *疾病监测*, 2023, 38(8): 944-950.
- [22] 赵慧, 王志锐, 巨韩芳, 等. 2020 年天津市肺结核耐药流行病学特征及影响因素分析[J]. *疾病监测*, 2023, 38(1): 57-63.
- [23] 郭雪丽, 马晓雪, 陈慧娟, 等. 1 446 例耐多药肺结核患者特征及治疗情况分析[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(15): 2835-2839.
- [24] 龙茜, 林玫, 蓝如束, 等. 广西壮族自治区边境与非边境地区耐药肺结核疫情及其影响因素[J]. *中国防痨杂志*, 2019, 41(5): 564-568.
- [25] 梁雅雪, 王华. 耐多药肺结核患者氟喹诺酮耐药因素分析[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(13): 1604-1608.
- [26] 贾芳, 宋青山, 黄海荣. 某医院广泛耐药结核病住院患者耐药特点及危险因素分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2019, 23(3): 336-340.
- [27] KHERABI Y, FRÉCHET-JACHYM M, RIOUX C, et al. Revised definitions of tuberculosis resistance and treatment outcomes, France, 2006 - 2019[J]. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28(9): 1796-1804.
- [28] 胡彦, 刘洁, 沈静, 等. 重庆地区耐多药结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物耐药的相关基因特征分析[J]. *中国防痨杂志*, 2018, 40(10): 1060-1065.