

· 论著 ·

实时荧光定量PCR法分析结核分枝杆菌耐药性的价值观察

张 三^{1,*} 唐珊珊²

1.新郑市人民医院科检验科 (河南 新郑 451100)

2.新郑市城关乡卫生院检验科 (河南 新郑 451100)

【摘要】目的 探究实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)法在结核分枝杆菌(MTB)耐药性中的应用价值。方法 选择2018年10月至2020年11月我院收治的结核病患者84例,采用FQ-PCR法分析,以罗氏药敏比例法作为检测MTB耐药性的“金标准”,分析FQ-PCR法在MTB耐药性中的应用价值。结果 FQ-PCR法分析MTB耐药性中各药物灵敏度、特异度、阳性预测值比较差异有统计学意义($P<0.05$);而准确度及阴性预测值比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。kappa检验显示:对阿米卡星检测一致性不佳(kappa值为0.279);对利福平、异烟肼、莫西沙星及乙胺丁醇一致性尚可(kappa值分别为0.637、0.631、0.578、0.623);对链霉素一致性良好(kappa值为0.815)。结论 FQ-PCR法在MTB耐药性分析中具有较高的临床应用价值,优势明显,可为临床诊断及用药提供可靠依据。

【关键词】结核分枝杆菌;实时荧光定量聚合酶链反应;罗氏药敏比例法;耐药性

【中图分类号】R378.91

【文献标识码】A

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2022.05.022

Analysis of Drug Resistance of Mycobacterium Tuberculosis by Real-Time Fluorescence Quantitative PCR Method

ZHANG San^{1,*}, TANG Shan-shan².

1.Department of Inspection, Xinzheng People's Hospital, Xinzheng 451100, Henan Province, China

2.Department of Clinical laboratory, Chengguan Township Health Center, Xinzheng 451100, Henan Province, China

Abstract: **Objective** To explore the application value of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) in drug resistance of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in vitro. **Methods** 84 cases of tuberculosis in our hospital from October 2018 to November 2020, FQ-PCR analysis, A "gold standard" for the detection of MTB drug resistance, to analyze the application value of FQ-PCR method in MTB drug resistance. **Results** The sensitivity, specificity and positive predictive value of MTB drug resistance were significantly different by FQ-PCR method ($P<0.05$); And accuracy and negative predictive values, and the difference was not statistically significant ($P>0.05$). kappa test showed that the consistency of amikacin detection was not good (kappa value was 0.279); Consistency of rifampicin, isoniazid, moxifloxacin and ethambutol was acceptable (kappa values were 0.637, 0.631, 0.578, 0.623, respectively); Good consistency with streptomycin (kappa value 0.815). **Conclusion** FQ-PCR method has high clinical value in MTB drug resistance analysis. The advantage is obvious. It can provide reliable basis for clinical diagnosis and medication.

Keywords: Mycobacterium Tuberculosis; Real-Time Fluorescence Quantitative Polymerase Chain Reaction; Roche Drug Sensitivity Ratio Method; Drug Resistance

结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis, MTB)感染可引发结核病,对患者生命安全构成严重威胁。近年来,结核病发病率逐年上升,小部分结核病患者病情进展为利福平耐药结核,而大部分患者发展为多重耐药结核,给治疗增加难度^[1]。现阶段,临床对于MTB的检测主要依靠药物敏感度试验及结核菌培养等,虽该方法准确性好且操作成本较低,但培养周期较长,在此期间内易延误患者最佳治疗时机^[2]。随着医疗技术的快速发展,实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)法在临床上的应用具有检测速度快、检查成本低等特点,可为临床诊断MTB耐药提供可靠依据^[3]。鉴于此,本研究采用实施荧光定量PCR法分析MTB耐药性,旨在探究其临床应用价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2018年10月至2020年11月我院收治的结核病患者84例,均符合《肺结核诊断和治疗指南》^[4]中疾病相关诊断标准,本研究获伦理委员会批准。其中男45例,女39例;年龄19~69岁,平均年龄(44.58±3.61)岁。

1.2 方法 (1)核酸提取:将80L核酸提取液加入核酸提取试管中,刮取少量菌落转移至试管中,在核酸快速提取仪下振荡10min,并将其置于95℃金属浴内10min,随后取出并离心处理1min获得核酸,用于扩增操作。(2)检测准备及原理:对利福平、链霉素、异烟肼、阿米卡星、乙胺丁醇、莫西沙星等药物的耐药状况进行分析。按照待检测样本数量的5倍,准备200L平盖PCR薄壁管,分别从试剂盒中提取扩增反应液A/B/C/D/E,彻底融化后漩涡震荡。按照每管25L分装各扩增反应液至PCR薄壁管中,随后将其转移至PCR模板加样区。向每个样品中加入同一模板DNA 5L,保证每管总体积为30L。

【第一作者】张 三,男,副主任技师,主要研究方向:化学发光。E-mail: rywiwi66@sina.com

【通讯作者】张 三

(3)PCR扩增及结果的判断：将PCR反应管置于荧光PCR仪中，行扩增操作，检测结果由MTB耐药基因检测分析系统进行辅助的判读。

1.3 观察指标 以罗氏药敏比例法作为检测MTB耐药性的“金标准”，分析FQ-PCR法在MTB耐药性中的应用价值，包括灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值、阴性预测值。以n表示总例数，a表示真阳性，b表示假阳性，c表示假阴性，d表示真阴性。灵敏度=a/(a+c)，特异度=d/(b+d)，准确度=(a+d)/n，阳性预测值=a/(a+b)，阴性预测值=d/(c+d)。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0软件处理数据，计数资料用百分比表示，采用 χ^2 检验，FQ-PCR法诊断MTB耐药性与罗氏药敏比例法检查结果的一致性使用kappa检验，kappa值

≥0.75表示一致性良好，0.4~0.74表示一致性尚可，<0.4表示一致性不佳；P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

FQ-PCR法分析MTB耐药性中各药物灵敏度、特异度、阳性预测值比较差异有统计学意义(P<0.05)；而准确度及阴性预测值比较，差异无统计学意义(P>0.05)，见表1。kappa检验显示：对阿米卡星检测一致性不佳(kappa值为0.279)；对利福平、异烟肼、莫西沙星及乙胺丁醇一致性尚可(kappa值分别为0.637、0.631、0.578、0.623)；对链霉素一致性良好(kappa值为0.815)。

表1 FQ-PCR法在MTB耐药性分析中的应用价值

FQ-PCR法	罗氏药敏比例法(例)		灵敏度[% (n)]	特异度[% (n)]	准确度[% (n)]	阳性预测值[% (n)]	阴性预测值[% (n)]	kappa值
	耐药	敏感						
利福平	耐药	28	87.50(28/32)	78.85(41/52)	82.14(69/84)	71.79(28/39)	91.11(41/45)	0.637
	敏感	4						
链霉素	耐药	19	79.17(19/24)	95.00(57/60)	90.48(76/84)	86.36(19/22)	91.94(57/62)	0.815
	敏感	5						
异烟肼	耐药	21	63.64(21/33)	96.08(49/51)	83.33(70/84)	91.30(21/23)	80.33(49/61)	0.631
	敏感	12						
阿米卡星	耐药	2	18.18(2/11)	100.00(73/73)	89.29(75/84)	100.00(2/2)	89.02(73/82)	0.279
	敏感	9						
莫西沙星	耐药	8	72.73(8/11)	91.78(67/73)	89.29(75/84)	57.14(8/14)	95.71(67/70)	0.578
	敏感	3						
乙胺丁醇	耐药	11	52.38(11/21)	100.00(63/63)	88.10(74/84)	100.00(11/11)	86.30(63/73)	0.623
	敏感	10						
χ^2 /Fisher精确检验			22.043	31.405	4.406	11.935	9.245	
P			0.001	0.000	0.493	0.036	0.100	

3 讨论

现阶段，临床对于结核病的治疗主要采用药物的方式，通常采用一线及二线抗痨药物联合使用，其中一线抗痨药物包括利福平、链霉素、乙胺丁醇、异烟肼，可取得一定的效果，安全性高^[5-6]。而二线抗痨药物包括氟喹诺酮类、阿米卡星、卡那霉素类药物，但单纯用药存在较高的风险，加之不规则的错误化疗，使得药物耐药性大大上升，患者治疗依从性明显下降^[7-8]。故对上述抗结核药物耐药性行积极的管理有助于更好的给出治疗方案指导临床治疗。

既往传统培养法在药敏结果检测中耗时较长，易延误患者治疗时机。近年来，分子诊断技术在MTB耐药检测中得到广泛应用，MTB耐药的产生是因自身基因突变而导致^[9]。因此，对某些基因片段发生突变在耐药菌株中占较大比例时，可通过对基因片段进行检测判断该菌株的耐药情况。本研究结果显示，FQ-PCR法分析MTB耐药性中各药物灵敏度、特异度、阳性预测值比较差异有统计学意义，而准确度及阴性

预测值比较差异无统计学意义。kappa检验显示：对阿米卡星检测一致性不佳(kappa值为0.279)；对利福平、异烟肼、莫西沙星及乙胺丁醇一致性尚可(kappa值分别为0.637、0.631、0.578、0.623)；对链霉素一致性良好(kappa值为0.815)，提示FQ-PCR法在MTB耐药性诊断中应用价值较高，能够检出MTB对药物的耐药性，且一致性较强。究其原因可知FQ-PCR法具有检测时间短、成本低、药物检测种类多等优势，能够有效避免PCR污染等导致检测结果差异等问题。本研究中FQ-PCR法对阿米卡星耐药性检出一致性不佳，较好说明该基因型检测位点的耐药监测准确性不高，或存在其他的耐药基因位点的突变。另该方法对其他药物耐药性检测虽灵敏度不高，或存在耐药表型与基因型存在差异，可能与MTB表型耐药不稳定而发生改变相关，亦或与部分突变为无意义突变等不会对MTB耐药性造成影响^[10]。

综上所述，实施荧光定量PCR法在MTB耐药性检测中应用价值较高，具有较好的应用前景，可为临床用药提供指导，值得推广。

参考文献

- [1] 阳央, 冯智, 侯欢, 等. 荧光聚合酶链反应熔解曲线法快速检测结核分枝杆菌及异烟肼耐药突变的临床应用价值[J]. 中国感染与化疗杂志, 2019, 19(4): 405-409.
- [2] 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.
- [3] 孙照刚, 李自慧, 张洪静, 等. 适用于结核分枝杆菌微测序耐药基因芯片的多重PCR体系的优化与评价[J]. 临床肺科杂志, 2020, 25(2): 163-166.
- [4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2013, 20(2): 7-11.
- [5] 阳幼荣, 吴雪琼. 结核分枝杆菌耐药检测及其临床意义[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, 16(4): 18-22.
- [6] 薛建昌, 吴海峰, 郑浩, 等. 3种结核分枝杆菌耐药检测方法的对比研究[J]. 河北医科大学学报, 2019, 40(11): 1312-1316.
- [7] 马进宝, 杨翰, 任斐, 等. 三种分子生物学方法检测结核分枝杆菌耐药性的效能分析[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(4): 440-446.
- [8] 姚梅宏, 郑宇辉, 杨映红. 不同荧光定量PCR试剂盒在结核分枝杆菌检测中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(12): 1392-1394.
- [9] 陈振华, 张小萍, 余艳艳, 等. 结核分枝杆菌固体培养结合不同分子生物学检测的应用分析[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(4): 273-275, 279.
- [10] 宋华峰, 赵静, 胥萍. 荧光定量PCR在结核分枝杆菌快速诊断中的研究[J]. 中国热带医学, 2018, 18(7): 687-690.

(收稿日期: 2021-05-09)