

一种快速判断对利福布汀敏感的 利福平耐药菌株的简易方法

刘国辉 张丽娜 詹森林 袁静 王平^{*}

(深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518000)

〔摘要〕 **目的:** 利用结核分枝杆菌/利福平耐药荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF, 简称Xpert检测)中各探针的检测结果, 判断在对利福平(RFP)耐药的菌株中, 是否同时对利福布汀(RFB)耐药。**方法:** 收集2018年6月至2021年5月在深圳市第三人民医院就诊的耐药结核患者共548例。收集患者的各类标本, 包括痰、支气管肺泡灌洗液、胸水、脑脊液、尿液、脓液、病理组织及穿刺物等进行分枝杆菌培养。然后对培养物分别进行Xpert检测及结核快速药敏试验(绝对浓度法)。以绝对浓度法为金标准, 将Xpert检测提示耐药的结果与金标准中RFB的结果进行对照分析。**结果:** Xpert检测结果任何一个探针阳性, 提示对RFB交叉耐药的检验综合符合率在51.64%。Xpert检测中A、C、D+E探针阳性的菌株, 提示对RFP存在耐药, 但对RFB全部敏感, 其他探针对药物灵敏度的指示意义不大。以绝对浓度法结果作为金标准, Xpert检测各探针对RFB耐药性的检测结果具有不同的灵敏度与特异性。**结论:** Xpert检测结果部分探针阳性, 可以用来作为耐RFP患者选取RFB替代的指示性标志。

〔关键词〕 结核分枝杆菌; 结核分枝杆菌/利福平耐药荧光定量核酸扩增检测技术; 耐多药肺结核; 利福平; 利福布汀

〔中图分类号〕 R 521 〔文献标识码〕 A

A Quick Detection Strains of Rifampicin-resistant that are Sensitive to Rifabutin

LIU Guo-hui, ZHAN Li-na, ZHAN Sen-lin, YUAN Jing, WANG Ping^{*}

(Shenzhen Third People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518000)

〔Abstract〕 **Objective** To explore the application value of Xpert MTB/RIF test probes in rifampicin-resistant patients. **Methods** A total of 548 specimens collected from the third people's Hospital of Shenzhen were analyzed, including sputum, bronchoalveolar lavage fluid, pleural and ascites, cerebrospinal fluid, urine and so on (2018.6 to 2021.5). The Xpert MTB/RIF assay and absolute concentration susceptibility test were performed simultaneously. Through the analysis of the two results, the relationship between the probes of Xpert MTB/RIF assay and the resistance of rifampin and rifampin was obtained. **Results** The Xpert test result is positive for any probe, which indicates that the comprehensive coincidence rate of the RFB cross-resistance test is 51.64%. The strains with positive A, C, D+E probes in the Xpert test indicate that they are resistant to RFP, but are all sensitive to RFB. Other probes are of little significance as an indicator of drug sensitivity. Using the absolute concentration method as the gold standard, the Xpert detection results for the resistance of each probe to RFB have different sensitivity and specificity. **Conclusion** The Xpert test results are positive for some probes, which can be used as an indicator for RFP-resistant patients to select RFB replacement.

〔Key Words〕 Mycobacterium tuberculosis; Mycobacterium tuberculosis/rifampicin-resistant fluorescent quantitative nucleic acid amplification detection technology; Multidrug-resistant tuberculosis; Rifampin; Rifabutin

结核病是一种危害人类健康的传染性疾病, 我国为结核高发国家之一。随着一线抗结核药物的广泛应用, 疫情一度被控制。近20年来, 随着耐一线结核药物的结核菌感染的病人的逐渐增多, 疫情有卷土重来的趋势。监测统计, 新

的结核病患者中, 有10.2%的患者会出现对至少一种抗结核药物耐药。我国每年新增耐多药结核(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)患者约12万人。MDR-TB传染性更强, 治愈率低, 病死率高, 因此治愈MDR-TB患者是有

〔收稿日期〕 2021-07-23

〔基金项目〕 广东省高水平临床重点专科项目资助课题(SZGSP010, SZGSP011); 深圳市医学重点学科(2020-2024年)建设经费项目课题(SZXX076, SZXX079)

〔作者简介〕 刘国辉, 男, 副主任医师, 主要研究方向是结核病个体化精准治疗及结核病相关检测设备研发。

〔*通信作者〕 王平(E-mail: TracyWP@163.com; Tel: 13500041160)

效控制耐药结核传播的关键。目前国内外用于治疗 MDR-TB 的药物, 主要为贝达喹啉、普瑞玛尼、利奈唑胺等^[1], 但价格昂贵, 副作用大, 患者在经济上难以承受。由于利福霉素类的作用机制和作用靶点基本相同, 一旦发生利福平 (rifampicin, RFP) 耐药, 临床上通常就不再推荐利福霉素类用于治疗 MDR-TB^[2-3]。但是临床实践中发现, 部分 RFP 耐药的菌株对利福布汀 (rifabutin, RFB) 仍旧敏感^[4], 提示 RFB 仍有希望用于部分 MDR-TB 患者, 从而提高社会效益。因此, 笔者对结核分枝杆菌/利福平耐药荧光定量核酸扩增检测 (Xpert mycobacterium tuberculosis/rifampicin, Xpert MTB/RIF) 技术 (以下简称 Xpert 检测) 和常规药敏试验检测结果进行回顾性分析, 以期通过快速检测技术从耐 RFP 的患者中识别出对 RFB 敏感的患者。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性选取 2018 年 6 月至 2021 年 5 月本院 Xpert 检测确诊耐药肺结核的患者 548 例, 采集痰、支气管肺泡灌洗液、胸水、脑脊液、尿液、脓液、病理组织及穿刺物等样本, 进行 Xpert 检测、分枝杆菌培养及绝对浓度法药敏试验。其中男性 339 例, 女性 209 例, 年龄 10~90 岁, 中位年龄为 38 (28, 54) 岁。

1.2 仪器与试剂

罗氏培养基、RFP、异烟肼、RFB 等药敏培养基均购自珠海贝索生物技术公司 (BASO); BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养监测系统及其配套试剂盒购自美国 BD 公司; Xpert 检测系统及其配套试剂盒购自美国 Cepheid 公司。结核分枝杆菌标准株 (H37Rv, ATCC27294) 购自中国药品生物制品检定所。

1.3 检测方法

1.3.1 标本处理 按照结核病诊断实验室检验流程进行操作 (《结核病实验室检验规程》^[5]), 将痰、纤维支气管镜灌洗液、脓液等标本加入等量 4% 氢氧化钠; 组织标本用匀浆器匀浆后加等量 4% 的氢氧化钠, 振荡后静置 20 min, 加入 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 约 3~4 mL 混匀离心, 弃上清液, 沉淀混匀后备用。清亮的胸腹水, 脑脊液离心后取沉淀备用。

1.3.2 结核菌罗氏培养 将 1.3.1 处理好的标本无菌吸取 0.5 mL 置入 MGIT 结核试管, 置于 BD MGIT 960 机器上进行培养, 按仪器说明判读培养阳性的结果; 取 1.3.1 处理好的标本 0.1 mL 接种到培养基上, 于 37 °C 培养箱培养, 每 3 d 观察记录结果, 阴性培养至第 42 天。

1.3.3 结核快速药敏试验 (绝对浓度法) 按照《结核病实验室检验规程》^[5] 进行操作。接种后, 35 °C 培养 28 d。根据使用说明书, RFB 的高低临界浓度分别设定为 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。高临界浓度或低临界浓度培

养基中显示有细菌生长, 均解读为对 RFB 耐药。

1.3.4 Xpert 检测 取 1.3.1 处理好的标本, 采用美国 Cepheid 公司生产的 Xpert 检测系统, 按试剂盒说明书操作, 获得检测结果。共有 5 个探针对 RFP 耐药决定区 (rifampicin resistance-determining region, RRDR) 进行检测, 分别为 A、B、C、D、E 探针。Xpert 检测结果判断: 结核分枝杆菌脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 检出 (极低、低、中、高) 和未检出, 5 个指示探针任何 1 个被检出, 均提示 RFP 耐药。

1.4 统计学方法

应用 R 3.6.4 统计软件进行统计分析, 对符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行两组间比较, 不符合正态分布的计量资料以中位数 (四分位间距) 表示, 采用 Mann-Whitney *U* 检验进行组间比较; 计数资料以绝对数 (百分比) 表示, 采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验, 诊断灵敏度、特异度等检查结果以百分比表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者临床特征

共纳入 548 例患者, 根据绝对浓度法 RFB 耐药情况分为 RFB 耐药组和 RFB 敏感组, 分析两组间基线临床特征的差异, 结果显示, 两组患者间的性别、年龄、标本类型、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染情况比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 RFB 耐药与 RFB 敏感患者的临床特征比较

临床特征	RFB 耐药 (<i>n</i> = 283)	RFB 敏感 (<i>n</i> = 265)	χ^2/Z	<i>P</i>
年龄 $M(P_{25}, P_{75})$, 岁	36(27,48)	38(28,54)	1.541	0.123
性别 <i>n</i> (%)				
男	176(62.19)	163(61.51)	0.000	0.996
女	107(37.81)	102(38.49)		
HIV 感染 <i>n</i> (%)				
不详	245(86.57)	245(92.45)	-	0.196
阴性	38(13.43)	19(7.17)		
阳性	0(0.00)	1(3.77)		
标本类型 <i>n</i> (%)				
痰	134(47.35)	100(37.74)	3.049	0.081
支气管/肺泡灌洗液	72(25.44)	86(32.45)		
其他标本	77(27.21)	79(29.81)		

注: “-”表示 Fisher 精确检验; RFB—利福布汀; HIV—人类免疫缺陷病毒

2.2 548 例样本的探针阳性分布情况

548 例检测标本中, 采用绝对浓度法检测出 283 例 RFB 耐药性, 采用 Xpert 检测全部检测出 *rpoB* 基因突变, 即 5 个探针中至少有 1 个阳性; 其中以 E 探针阳性占比最高, 共 318 例 (58.03%), 其次为 D 探针, 共 80 例 (14.60%); Xpert 检测中 A、C、D + E 探针阳性的菌株, 提示对 RFP 存在耐药, 但对 RFB 全部敏感, 其他探针对药物灵敏度的指示意义不大, 见表 2。

表2 548例样本的探针阳性分布情况 (n(%))

探 针	阳性 (n = 548)	RFB	
		敏感 (n = 265)	耐药 (n = 283)
A	48(8.76)	48(16.96)	0(0.00)
AB	10(1.82)	7(2.47)	3(1.06)
AD	11(2.01)	5(1.77)	6(2.12)
AE	1(0.18)	1(0.35)	0(0.00)
ADE	1(0.18)	1(0.35)	0(0.00)
B	52(9.49)	41(14.49)	11(3.89)
BD	4(0.73)	3(1.06)	1(0.35)
BE	5(0.91)	4(1.41)	1(0.35)
C	8(1.46)	8(2.83)	0(0.00)
D	80(14.60)	44(15.55)	36(12.72)
DE	10(1.82)	10(3.53)	0(0.00)
E	318(58.03)	93(70.75)	225(79.51)
合计	548(100.00)	265(48.36)	283(51.64)

注: RFB—利福布汀

2.3 Xpert 检测对 RFB 耐药性的检测效能分析

以绝对浓度法检测结果为金标准, Xpert 检测各探针对 RFB 耐药性的检测结果具有不同的灵敏度与特异度。分析各个探针阳性与 RFB 药敏耐药的关系, A、C 探针阳性的样本中无一例 RFB 耐药, 与 E 探针的差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。

表3 Xpert 检测对 RFB 耐药性的检测效能分析

探 针	RFB 敏感 / 例	RFB 耐药 / 例	灵敏度 / %	特异度 / %
A				
阴性	217	283	0.00	81.89
阳性	48	0		
AB				
阴性	258	280	1.06	97.36
阳性	7	3		
AD				
阴性	260	277	2.12	98.11
阳性	5	6		
AE				
阴性	264	283	0.00	99.62
阳性	1	0		
ADE				
阴性	264	283	0.00	99.62
阳性	1	0		
B				
阴性	224	272	3.89	84.53
阳性	41	11		
BD				
阴性	262	282	0.35	98.87
阳性	3	1		
BE				
阴性	261	282	0.35	98.49
阳性	4	1		
C				
阴性	257	283	0.00	96.98
阳性	8	0		
D				
阴性	221	247	12.72	83.40
阳性	44	36		

(续表 3)

探 针	RFB 敏感 / 例	RFB 耐药 / 例	灵敏度 / %	特异度 / %
DE				
阴性	255	283	0.00	96.23
阳性	10	0		
E				
阴性	172	58	79.51 ^a	64.91 ^a
阳性	93	225		

与 A、C 探针比较, ^a $P < 0.01$

注: Xpert 检测—结核分枝杆菌 / 利福平耐药荧光定量核酸扩增检测; RFB—利福布汀

3 讨 论

3.1 利福霉素类的抗菌原理

RFP 的作用机制是通过与结核分枝杆菌 DNA 依赖的核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 聚合酶的 β 亚单位结合, 阻止该酶与合成 RNA 的底物所需的三磷酸核苷结合, 从而阻断结核菌的 RNA 转录过程, 使 RNA 和蛋白的合成停止, 导致细菌死亡。RNA 聚合酶的 β 亚单位是由 rpoB 基因编码。结核分枝杆菌对 RFP 耐药主要因为 rpoB 基因发生突变后, 导致 β 亚单位变异, 致使 RFP 靶点失效所致。这些突变主要是集中在 rpoB 中的 81 个高突变碱基区域 (RFP 耐药决定区, 对应 rpoB 基因的 507 ~ 533 位置的 27 个氨基酸, DDMD) 内的各种突变, 也有少量碱基插入或缺失现象。95% 以上的 RFP 耐药与 rpoB 基因突变有关。

RFB 作为利福霉素类抗菌药物, 与 RFP 一样, 具有抗菌谱广、抗菌作用强、毒副作用低等优点。临床上常见, 对于耐 RFP 的患者, 应用 RFB 是有效的。两者存在不完全的交叉耐药。有证据表明对 RFP 和 RFB 存在不完全交叉耐药性。根据表型或基因型 RFP 灵敏度检测, 估计有 20% 的病例对 RFP 耐药结核病有用^[6]。但未有文献明确对具体何种情况下 RFP 耐药患者适用 RFB。

3.2 Xpert 检测原理

Xpert 检测 (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) 是美国食品和药物管理局批准的自动核酸扩增试验, 可在 2 h 内检测结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 复合物 DNA 和 RFP (RIF) 耐药性^[7]。该方法在 2011 年获得了世卫组织的认可。

该系统采用半巢式 PCR, 针对 rpoB 基因 81 bp 的 RRDR 设计了 5 个分子信标探针 (分别以探针 A、B、C、D、E 命名), 以检测是否有结核分枝杆菌, 同时是否对发生突变, 从而对 RFP 耐药。同时以球芽孢杆菌 (bacillus sphaericus, SPC) 为内对照, 以判断 DNA 扩增是否存在抑制^[8]。

在 Xpert 检测设计的探针中, 其中 A 探针对应 507 ~ 511 位点, B 探针对应 512 ~ 517 位点, C 探针对应 518 ~ 522 位点, D 探针对应 523 ~ 527 位点, E 探针对应 528 ~ 533 位点。探针设计中, 将 5 个 RRDR 中最常见的突变位点, 分别覆盖 A (511)、B (516)、C (522)、D (526)、

E (531) 这 5 个探针。其中任何一个位点检测阳性, 均提示 *rpob* 发生突变, 间接提示细菌对 RFP 产生耐药。目前, 国内外关于 Xpert 检测在结核病诊断及 RFP 耐药报道较多^[9], 但关于 Xpert 检测的探针阳性的意义, 对 RFB 的临床意义报道不多。各个探针是否具有用药指导性的临床意义尚不明确。部分文献报道, 携带 D531V 突变的分离株, 尽管对 RFP 耐药, 但仍然对 RFB 敏感^[10]。而 D531V 刚好符合探针 E 标记的核酸检验序列。因此, 这一点提示笔者进一步分析各个探针的具体意义, 可能对 RFB 的使用, 有指导性意义。

同时, 由于 Xpert 检测速度快, 仅需 2~3 h 就可以得出结果。远远快于常规结核药敏检测时间。并且占地较小, 操作方便, 适合基层医院开展。如果能用 Xpert 检测提前分辨出对 RFB 敏感的感染株, 对于早期药物选择, 有临床指导意义。

3.3 数据结果分析

RFB 与 RFP 的作用机制近似, 因此存在交叉耐药的可能性。因为 RFB 作用的靶点也是 RRDR 之间, 所以这段区间的变异, 同样可能影响 RFB 的耐药情况。部分研究人员可能受到惯性思维引导, 认为两者是等同的, 而事实并非如此。

本研究以绝对浓度法为“金标准”, 将 RRDR 区间突变结果与 RFB 耐药情况进行了比对。综合本实验中 A、C、D + E 探针检测结果占比约 12.04%, 这 3 类情况下, 表型药敏全部对 RFB 敏感。因此这 3 种探针检出阳性突变, 提示该菌株虽然对 RFP 耐药, 但是对 RFB 是完全敏感的。由于 Xpert 检测时间只需要 2~3 h, 使用更为便捷。因此, 在传统药敏结果未回报前, 可以指导更换 RFP 为 RFB 治疗。

4 结 论

4.1 各探针检测阳性的临床意义

Xpert 检测中 A、C、D + E 探针阳性菌株, 对 RFB 敏感的准确率为 100.00%, 可以直接用来作为耐 RFP 患者选取 RFB 替代的指示性标志。这对于没有或者缺乏有效二线抗结核药物的患者, 是一个不错的选择。探针 D、探针 E 发生突变, 均有不同程度的 RFB 耐药情况发生。而探针 D + E 同时突变, 反而出现 RFB 全部敏感的现象, 考虑共同突变导致分子空间构型改变, 从而对 RFB 敏感的可能。但一共只有 10 例, 不能完全除外统计误差。由于传统药敏试验的人工操作部分较多, 因此对检验结果的稳定性可能有少许影响。但数量较大的标本数, 可能弥补这个不足。

4.2 Xpert 部分假阳性结果可能的原因

在数据中, 笔者发现部分 Xpert 检测提示耐药的患者, 传统药敏试验提示敏感。分析可能原因有 2 点: (1) 可能

出现无效突变, 但结果仍提示耐药探针阳性; (2) 存在人工检测误差可能。

4.3 本研究的亮点和不足

笔者未能对所有耐药菌株进行测序分析, 存在本研究的菌株标本可能都是常见突变的可能。但更大的可能是 RFB 的作用靶点仅仅局限于 B、D、E 等 3 个探针的位置, 而不是 A、C 两个探针的位置。作为临床应用方法而言, 需要简单便捷, Xpert 检测是一个不错的检测方法。对于利福霉素类的耐药机制, 有更深层提示, 需要进一步去发现和证明。

[参考文献]

- (1) Oelofse S, Esmail A, Diacon AH, et al. Pretomanid with bedaquiline and linezolid for drug-resistant TB: a comparison of prospective cohorts (J). *Int J Tuberc Lung Dis*, 2021, 25(6): 453-460.
- (2) 中华医学会结核病学分会. 中国耐多药和利福平耐药结核病治疗专家共识(2019年版)(J). *中华结核和呼吸杂志*, 2019, 42(10): 733-749.
- (3) 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2019年简版)(J). *中国防痨杂志*, 2019, 70(10): 1025-1073.
- (4) 刘银萍, 王杰, 张俊仙, 等. 结核分枝杆菌 *rpob* 基因突变与三种利福霉素类抗结核药物耐受相关性研究 (J). *中国病原微生物学杂志*, 2016, 11(11): 982-985.
- (5) 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: 59-65.
- (6) Rockwood N, Cerrone M, Barber M, et al. Global access of rifabutin for the treatment of tuberculosis—why should we prioritize this? (J). *Journal of the International AIDS Society*, 2019, 22(7): e25333.
- (7) Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology (J). *J Clin Microbiol*, 2010, 48(1): 229-237.
- (8) Bunsow E, Ruiz-Serrano MJ, Lopez Roa P, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens (J). *J Infect*, 2014, 68(4): 338-343.
- (9) 周洪经, 郭明日, 冯爽, 等. Xpert MTB/RIF 在快速诊断肺结核及利福平耐药中的临床应用 (J). *国际检验医学杂志*, 2016, 37(18): 2568-2570.
- (10) Farhat MR, Sixsmith J, Calderon R, et al. Rifampicin and rifabutin resistance in 1003 *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates (J). *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(6): 1477-1483.