

引用本文:秦万,王琼,欧维正,等.微孔药敏检测法检测耐多药结核病33例耐药分析[J].安徽医药,2022,26(1):91-93.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.01.021.

◇临床医学◇



## 微孔药敏检测法检测耐多药结核病33例耐药分析

秦万,王琼,欧维正,王明栋,徐勇

作者单位:贵阳市公共卫生救治中心检验科,贵州 贵阳 550001

基金项目:贵阳市科技计划项目(筑科合同[2018]1-41号)

**摘要:** 目的 探讨MicroDST™(微孔药敏检测法)微孔板法检测结核分枝杆菌的耐药情况分析。方法 用MicroDST™微孔板法对贵阳市公共卫生救治中心2018年1月至2019年11月期间部分用比例法药敏试验随机筛选的33例耐多药结核病(MDR-TB)阳性菌株进行16种抗结核药药物敏感性检测。结果 异烟肼、利福平耐药率与比例法比较符合率为97.0%(32/33)、93.9%(31/33);对16种药总耐药率33%(174/528);一线总耐药率70.5(93/132)、二线总耐药率20.5(81/396)。结论 微孔板法检测的MDR-TB病人筛选率与比例法具有较高符合率、且本地区MDR-TB病人的耐药情况较严重,应加强药物监测,选择有效药物化疗,而MicroDST™微孔板法的推广使用有利于MDR-TB诊断和药物筛选。

**关键词:** 广泛耐药结核; 结核,抗多种药物性; 耐多药结核病(MDR-TB); 微孔药敏检测法; 耐药率

### Analysis of drug resistance in 33 cases of multidrug-resistant tuberculosis by microporous antimicrobial susceptibility testing

QIN Wan, WANG Qiong, OU Weizheng, WANG Mingdong, XU Yong

Author Affiliation: Laboratory of Guiyang Public Health Treatment Center, Guiyang, Guizhou 550001, China

**Abstract:** **Objective** To explore the analysis of drug resistance of Mycobacterium tuberculosis detected by MicroDST™ (microporous drug sensitivity test) microplate method. **Methods** A total of 33 multi-drug resistant tuberculosis (mDR-TB) positive strains randomly selected by proportional method in Guiyang Public Health Treatment Center from January 2018 to November 2019 were selected for drug susceptibility detection of 16 anti-tuberculosis drugs by MicroDST™ microplate method. **Results** The drug resistance detection rate of isoniazid and rifampicin were 97.0% (32/33) and 93.9% (31/33), respectively. The total drug resistance rate to 16 drugs was 33% (174/528), the first-line total drug resistance rate was 70.5 (93/132) and the second-line total drug resistance rate was 20.5 (81/396). **Conclusion** The screening rate of MDR-TB patients detected by microplate method is in high accordance with the proportion method, and the drug resistance of MDR-TB patients in this area is serious, so it is necessary to strengthen drug monitoring and select effective drug chemotherapy, while the promotion and use of MicroDST™ microplate method is conducive to MDR-TB diagnosis and drug screening.

**Key words:** Extensively drug-resistant tuberculosis; Tuberculosis, multidrug-resistant; MDR-TB; Microporous plate method; Drug resistance rate

耐多药结核病(MDR-TB)是指结核病病人感染的结核分枝杆菌体外细菌耐药的药敏试验(DST)证实至少同时对异烟肼和利福平耐药的结核病<sup>[1-3]</sup>。

结核耐药机制十分复杂,包括结核菌细胞壁结构与组成变化、结核菌自身的药物外排泵系统、结构药物靶编码基因发生突变<sup>[4]</sup>。我国是耐药结核病流行国家之一<sup>[5-11]</sup>。而贵州省是我国结核病高发病率、高耐药率及高负担率<sup>[12]</sup>。同时也是结核病高死亡率的地区之一。药敏检测技术的不断完善和提高,由以前几种抗结核药药敏试验到现在十几种药一次性就可以检测到药敏的耐药情况,而且7~14 d就可以出报告,这就是笔者以下重点介绍的MicroD-

ST™微孔板法一次性可检测16种抗结核药药敏情况。该法在本地区的推广使用有利于MDR-TB的发现及有效药物筛选应用,为临床指导用药,减少耐药菌株的产生。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集2018年1月至2019年11月贵阳市公共卫生救治中心罗氏比例法药敏试验随机筛选的MDR-TB病人各种标本罗氏培养阳性菌株33例进行16种常用抗结核药进行药敏试验,其中男25例,女8例,年龄范围18~73岁,平均年龄34.70岁。

**1.2 试剂与仪器** MicroDST™微孔板药敏检测试剂盒(培养法)由珠海银科医学工程股份有限公司

提供;细菌超声分散计数仪由体必康生物有限公司提供;YK-909分枝杆菌微孔板药敏读仪、YK-96小型全自动移液平台均由珠海银科医学工程股份有限公司提供。采用一、二线抗结核药,包括四种一线药为利福平、异烟肼、链霉素、乙胺丁醇和12种二线药为利福喷汀、左氧氟沙星、阿米卡星、卷曲霉素、丙硫异烟肼、力克肺疾、莫西沙星、对氨基水杨酸、克拉霉素、利福布汀、卡拉霉素、氯法齐明。

**1.3 检测方法** MicroDST™微孔板药敏检测:取出冻干杂菌抑制剂旋开瓶盖,将无菌稀释液全部加入充分混匀后加100 μL于药敏培养基瓶内盖好盖充分混匀,用无菌吸管吸取180 μL培养液加入到A1或E1、B1和F1孔,分别作为1/10、1/100参照孔,再吸取200 μL培养基加入到C1、D1或G1、H1作为阴性对照孔;将培养菌株通过超声比浊1.5个麦氏单位后加100 μL于培养基中混匀,然后给每孔加200 μL含菌液的药敏培养基(除上述4孔),再吸20 μL至A1或E1孔作为1/10参照孔,从A1至E1孔吸取20 μL至B1或F1作为1/100参照孔,盖上盒盖,最后用透明胶布沿周边封三圈后放入自封袋密封封口,置37℃培养7~14 d肉眼观察或通过YK-909判读,报告按照防痨规程执行。

**1.4 质量控制** 本试剂盒对标准减毒株H37Rv(ATCC25277)的检测结果为阳性对照孔经培养后生长好,接种到药敏孔经培养后完全受抑制,鉴定为结核分枝杆菌,药敏测定为敏感;对阴性质控品的检测结果为阴性。同时,如遇个别菌活力较弱、菌液浓度调节过小或菌悬液添加过少等特殊菌株将会导致培养时间过长或不出结果,则应延长培养时间直至21 d时,阳性对照孔及药敏孔无变化,则应传代培养,重做实验。除此之外,菌悬液浓度过高或菌悬液添加过多,则会出现假阳性,故操作规程务必严格按照微孔板药敏说明书进行。

## 2 结果

**2.1 药敏检测的6种抗结核药结果** MDR-TB病人菌株33例在比例法药敏检测的6种抗结核药结果对比,见表1。

表1 MDR-TB菌株33株的MicroDST™微孔板和罗氏比例法药敏试验结果比较

药品名称	MicroDST™微孔板法/株	罗氏比例法/株	符合率/%
链霉素	23	24	95.8
异烟肼	32	33	97.0
利福平	31	33	93.9
乙胺丁醇	7	8	87.5
左氧氟沙星	1	1	100
卡那霉素	8	8	100

**2.2 微孔板药敏法检测的33株MDR-TB其余10种二线耐药率** 利福喷汀78.8%(26/33);阿米卡星3.0%(1/33);卷曲霉素3.0%(1/33);丙硫异烟胺24.2%(8/33);力克肺疾33.3%(11/33);莫西沙星3.0%(1/33);对氨基水杨酸21.2%(7/33);克拉霉素12.1%(4/33);利福布汀18.2%(6/33);氯法齐明3.0%(1/33)。

**2.3 MicroDST™微孔板法对33株MDR-TB菌株检测的总耐药情况** 4种一线抗结核药总耐药数为93,耐药率为:70.5%(93/132);12种二线抗结核药总耐药数为81,耐药率为:20.5%(81/396),一二线总耐药率为:33%(174/528)。(33×4=132,33×12=396分别表示33株菌株对4种一线和12种二线抗结核药的总药数;174则表示一二线耐药的总数,即93+81=174,33×16=528则表示33株菌株对16种抗结核药的总药数)。

## 3 讨论

MDR-TB是造成全球结核病疫情回升的重要因素之一,也是结核病防治的难题,治疗难度大<sup>[13]</sup>。本研究对以上16种抗结核药进行药敏测试以便了解本地区MDR-TB病人的耐药情况。从以上结果可以看出,这两年MDR-TB病人的耐药情况仍然很严重,而且有的病人多种耐药还很严重,MDR-TB可进一步发展为广泛耐药结核病(XDR-TB),即结核病人感染的Mtb经体外DST证实耐多药的基础上至少同时对一种氟喹诺酮类和一种二线注射类抗结核药物耐药<sup>[14]</sup>。治疗的难度进一步地加大,所以笔者以MicroDST™微孔板法检测结核药较多的试验来进行耐多药分析,以便共同探讨和如何提高耐多药结核病人的治愈率。

罗氏培养比例法称为“金标准”法,由于检测时间较长,需要4~6周方能出结果,而且检测的药敏种数也不多,绝对浓度法也同样需要较长的检测周期,这给结核的治疗辅助作用带来了一定的难度。而MicroDST™微孔板MIC药敏属于表型药敏的升级换代产品,具有一定的技术先进性,故MicroDST™微孔板法的出现和推广对结核治疗的辅助便起到了很好的作用,与传统比例法也有很高的符合率,因而对二线抗结核药药敏的检测是可靠的,本研究结果也符合这一点。预期的效果也得到了广大临床医生的认可<sup>[15]</sup>。此法操作简单,便于自动加样和批量检测,特别是对于我们结核病人较多的专科医院,需要做药敏的病人较多,带来更为方便的一种检测方法,不仅如此,该法的检测周期也比传统的比例法或绝对浓度法短,只需7~14 d就可出检验报告,这便是MicroDST™微孔板法的优点。与此同时,

据李静等<sup>[16]</sup>等报告, BACTEC-MGIT960法的药敏检测一线药结果与罗氏比例法药敏检测结果的对比结果比MicroDST™法药敏检测一线药与传统的罗氏比例法对比的结果的药物敏感性、特异性及符合率都高,而且两者之间有比较好的一致性,可见MicroDST™的技术已接近BACTEC-MGIT法的技术。由于此检测方法是最近几年投入使用的新技术,以前不足的地方也有了很大的提高,对利福平与异烟肼的检出结果来看,在MDR-TB病人中对异烟肼耐药检出率达97.0%(32/33),而对利福平的耐药检出率则为93.9%(31/33),同时其他四种抗结核药的耐药符合率也是相当高的,所以通过不断改进和进一步地完善该检测技术是值得推荐做结核药敏的好方法。

在进行抗结核治疗时,必须高度重视当地结核菌的耐药情况<sup>[17]</sup>。贵州是我国结核病高发率、高耐药率及高负担地区之一<sup>[18]</sup>。由以上结果可以看出,本地区的结核病人耐药情况仍然十分严重,而且对一线和二线的耐药都呈现多重耐药,所以进行早期的耐药结核病检测并加以明确诊断、及时制订有效的治疗方案进行治疗,是治疗成功的主要因素<sup>[19]</sup>。本研究的对象对二线抗结核药耐药较高的是Rft及PI,耐药率依次为78.8%和33.3%,Rft耐药率高的原因可能是利福霉素类药物具有交叉耐药的特点。同时,本地区MDR-TB病人对左氧氟沙星、卷曲霉素、莫西沙星、克拉霉素、氯法齐明的耐药率比较低,可以考虑根据病人实际情况联合用药的治疗方案。

MDR-TB治疗疗程长,通常需2~3年,且效果差,死亡率高<sup>[20]</sup>。除了加强病人规范治疗和相关的结核病药敏检测外,力争在新药和新疫苗研制以及新诊断方法上取得突破<sup>[21]</sup>,就有可能破解MDR-TB病人治疗难度或遏制结核病的发病率。近年来,将克拉维酸加入含有敏感的二线药物方案中治疗耐药药/广泛耐药肺结核,可提高痰涂片及痰培养的转阴率,对MDR-TB或XDR-TB的治疗效果较好,且罗美培南血脑屏障穿透率高,中枢神经系统不良反应发生低,在耐药的TBM(耐药药结核性脑膜炎)治疗中具有一定优势<sup>[22]</sup>。

综上所述,本地区MDR-TB病人多种耐药较严重, MicroDST™法药敏技术在本地区的推广使用下,对MDR-TB病人的筛选和提供治疗方案都有很大的帮助,当然该技术也存在一些不足的地方,比如在本单位开展的两年多发现,对16种抗结核药检测中克拉霉素的药敏检测不够稳定,此外就是与罗氏药敏“标准法”检测的利福平与异烟肼依然存在一定的误差,这还需要不断改进方能解决。

## 参考文献

- [1] 李琦,李亮. 耐多药或利福平耐药结核病长期化疗方案与短程化疗方案的利与弊[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(5): 333-338.
- [2] 刘盛盛,王莲芝,唐神结. 耐多药和利福平耐药结核病化学治疗研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(4): 371-375.
- [3] 杨书娥. 20例耐多结核病的心理护理干预方法探讨[J]. 健康必读, 2019(6): 102.
- [4] 秦万,欧维正,蒙俊,等. 对利福平与异烟肼多个基因耐药初治结核病1例报告[J]. 贵州医药, 2015, 39(12): 1138-1139.
- [5] WHO. World Health Organization global tuberculosis report 2016 [M]. Geneva: WHO, 2016: 137-171.
- [6] 马爱静,赵雁林. 耐药结核病的流行和监测现状[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(5): 502-506.
- [7] 唐神结,肖和平. 新世纪我国结核病的新特点及防治策略[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(6): 403-405.
- [8] 吴雪琼. 新型结核病疫苗的研究现状与发展趋势[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(3): 133-137.
- [9] 陆伟,傅衍勇. 我国耐药结核病控制的现状与展望[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2016, 5(4): 259-261.
- [10] 梁建琴. 切实关注耐药结核病的早期发现、早期诊断及规范治疗[J]. 中国医刊, 2019, 54(9): 929-932.
- [11] 王淑霞,高微微. 耐药肺结核的诊断与治疗[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(10): 681-683.
- [12] 张廷梅,熊敏,蔡翠,等. 9例广泛耐药肺结核患者临床分析[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(5): 252-253.
- [13] 秦万,欧维正,骆科文,等. 996例结核患者对利福平与异烟肼的耐药情况分析[J]. 贵州医药, 2014, 38(1): 66-68.
- [14] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2015)[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(5): 421-469.
- [15] 秦万,王琼,王明栋,等. RNA恒温扩增法与PCR-荧光探针法在含结核菌菌量较少标本中检出率的比较[J]. 贵州医药, 2019, 43(9): 1457-1459.
- [16] 李静,王智存,白广红,等. MicroDST™微孔板检测法对抗结核一、二线药物敏感性试验的临床价值[J/OL]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2018, 11(5): 583-587. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2018.05.014.
- [17] 侯婧,刘刚,韩君,等. 涂阳肺结核患者243例耐药特征分析[J]. 中国医药, 2019, 14(2): 222-225.
- [18] 陈静,陈峥宏,欧维正,等. 评估PCR-荧光探针法在临床标本诊断中的应用价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, (11): 2445-2446, 2470.
- [19] 邱蕾,王剑,杜斐斐,等. 96例耐药肺结核患者临床治疗结果分析[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2017, 6(1): 57-60.
- [20] 陆秀琴,周新风,周文健,等. 耐多药结核患者生存质量的研究进展[J]. 护理实践与研究, 2016, 13(12): 18-20.
- [21] 孙付胜,吴慧娜,谷洪梅,等. 耐药结核病防治研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(1): 86-89, 94.
- [22] 陈旋,张炜. 美罗培南联合克拉维酸对耐多药和广泛耐药结核分枝杆菌的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(1): 51-54.

(收稿日期:2020-01-19,修回日期:2020-02-04)