

四川省甘孜州 766 例患者结核分枝杆菌临床分离株 PCR 鉴定及耐药性分析

张煜

甘孜州藏族自治州疾病预防控制中心

DOI:10.12238/ffcr.v3i2.14109

[摘要] 目的：从四川省地区 766 例结核病临床病例中分离出 146 株结核分枝杆菌，经菌种鉴定，对耐药性进行分析。方法：收集四川省甘孜藏族自治州 2011 年 1 月—2018 年 12 月从肺结核患者分离培养的阳性菌株，进行菌型鉴定，采用比例法对 8 种抗结核药物进行药物敏感性测定。结果：本研究共对 146 株结核分枝杆菌临床分离菌株进行了药物敏感性检测，结核分枝杆菌总耐药率为 28.15%，耐多药率为 12.32% (17/146)。对 8 种抗结核药物 INH、RFP、OFX、SM、EMB、KM、AMK 与 CPM 的耐药率分别为 18.49%、13.01%、12.33%、11.64%、6.16%、1.37%、0.68% 和 0.68%。结论：检出四川省甘孜藏族自治州结核分枝杆菌耐药菌株较低，但其耐药率高于全国平均水平及部分地区，需应加强耐药菌监测以指导合理药物预防及临床治疗。

[关键词] 结核；分枝杆菌；微生物敏感性试验；耐药性

中图分类号：R52 文献标识码：A

Identification and Drug Resistance of 766 Strains of Mycobacterium Tuberculosis in Sichuan Province

Yu Zhang

Center for Disease Control and Prevention of Tibetan Autonomous Prefecture

[Abstract] Objective 146 Mycobacterium tuberculosis strains were isolated from 766 clinical cases of tuberculosis in Sichuan Province, and the strain identification and drug resistance were analyzed. Methods The positive strains isolated and cultured from pulmonary tuberculosis patients in Ganzi Prefecture, Sichuan Province from January 2011 to December 2018 were collected for bacterial type identification, and the proportion method was used to compare 8 anti-tuberculosis drugs. Results A total of 146 clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis were tested for drug susceptibility. The total drug resistance rate of Mycobacterium tuberculosis was 28.15%, and the multidrug resistance rate was 12.32% (17/146). The resistance rates to 8 anti-tuberculosis drugs INH, RFP, OFX, SM, EMB, KM, AMK and CPM were 18.49%, 13.01%, 12.33%, 11.64%, 6.16%, 1.37%, 0.68% and 0.68%. Conclusion The drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis detected in Ganzi Prefecture, Sichuan Province are relatively low, but the drug-resistant rate is higher than the national average level and some areas. It is necessary to strengthen the monitoring of drug-resistant bacteria to guide rational drug prevention and clinical treatment.

[Keywords] Tuberculosis; Mycobacterium; Microbial susceptibility test; drug resistance

1 前言

结核病 (Tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (Mycobacterium Tuberculosis, MTB) 引起的一种严重的人兽共患病，不仅给人来健康带来严重威胁，也对全球性的公共卫生造成极大危害^[1]。全球范围内，结核病作为主要的公共卫生问题之一，每年有数百万新发病例，导致大量死亡。近年来，耐药结核病的出现和蔓延对结核病的防控工作提出了严峻挑战。耐药结核病的治疗难度更大，疗程更长，治疗费

用更高，也更容易导致治疗失败和疾病传播。我国四川省甘孜藏族自治州属于经济较为不发达的西部地区，流调数据表明，该地区近年来结核病频发，且耐药情况较为严重，给本地区结核病疫情的防控带来了巨大挑战^[2]。本研究通过对四川省甘孜藏族自治州 2011 年 1 月—2018 年 12 月从肺结核患者分离培养的 MTB 阳性菌株进行菌种鉴定并进行恒温扩增荧光法进行验证，为本地区 TB 尤其是耐药 TB 监测、预防和治疗提供参考数据。

2 对象与方法

2.1 监测对象：2009年1月—2018年12月采集患者痰液，将涂片阳性进一步用改良酸性罗氏培养基进行MTB固体培养。

2.2 恒温扩增荧光法验证：使用结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（恒温扩增-实时荧光法）（DEAOU试剂盒）以及配套的全自动医用恒温扩增荧光分析仪（杭州迪奥生物技术有限公司-308C），按照产品说明书对阳性菌株进行验证，记录检测结果（阴性或阳性）并比较两种方法的符合率。

2.3 药敏实验：采用WHO/IUATLD耐药检测指定的比例法^[3]，挑取生长2—4周的结核分枝杆菌旺盛菌落，配制成1g/L菌液，以生理盐水稀释至 10^{-2} g/L、 10^{-4} g/L的菌液，分别接种对照培养基和含药物培养基（各接种0.01ml），37℃孵箱培养，4周读取菌落数。

2.4 PCR-荧光探针法进行耐药检测：PCR-荧光探针法检测结核分枝杆菌核酸阳性判定标准：①6-羧基荧光素（FAM）通道和6-甲基荧光素（HEX）通道同时阳性；②FAM通道阳性，HEX通道阴性。分枝杆菌核酸阴性的判定标准：FAM和HEX通道同时阴性。

2.5 统计学分析：采用SPSS 18.0统计软件进行分析，运用卡方检验进行组间耐药率差异比较，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 临床患者的基本情况

来自四川省甘孜藏族自治州的766份临床病例中，有146例患者的痰培养结果为阳性（19%），经菌种鉴定均为MTB。病人最大年龄77岁，最小年龄15岁，平均年龄36岁；其中男性69例，女性77例（图1）。

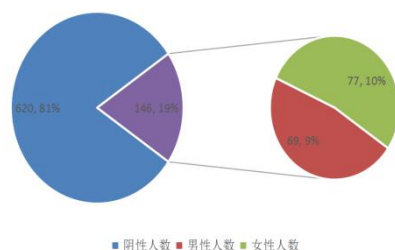


图1 结核分枝杆菌阳性占比

3.2 恒温扩增荧光法验证结果

将痰培养阳性患者进行编号1—146，对这146名患者的痰培养结果进行恒温扩增荧光法进一步鉴定，鉴定结果均为阳性（+），与痰培养结果的复合率为100%（见表1）。

表1 痰培养结果与恒温扩增荧光法结果对比

患者编号	痰培养结果	恒温扩增荧光法结果	复合率
1-50	阳性	+	100%

51-100	阳性	+	100%
101-146	阳性	+	100%

3.3 比例法检测结核分枝杆菌的耐药情况

MTB总的耐多药率为12.32%（17/146）。详细结果见表2）。

表2 分离菌对8种抗结核药物的耐药情况

药物名称	耐药菌株数	总计（n=146）		
		耐药率（%）	耐单药菌株数	耐单药率（%）
异烟肼（INH）	27	18.49	4	2.73
利福平（RFP）	19	13.01	0	0
氧氟沙星（OFX）	18	12.33	7	4.79
链霉素（SM）	17	11.64	3	2.05
乙胺丁醇（EMB）	9	6.16	2	1.37
卡那霉素（KM）	2	1.37	1	0.68
阿米卡星（AMK）	1	0.68	0	0
卷曲霉素（CPM）	1	0.68	0	0

3.4 PCR-荧光探针法检测结核分枝杆菌的耐药结果

146名患者的PCR-荧光探针法结果与耐药性结果完全吻合，符合率为100%（见表3）

表3 PCR-荧光探针法结果与耐药性结果对比

患者编号	耐药性结果	PCR-荧光探针法结果	复合率
1-50	阳性	+	100%
51-100	阳性	+	100%
101-146	阳性	+	100%

4 讨论

四川省甘孜藏族自治州属于我国经济较不发达的西部地区，对结核病知识了解上较为欠缺，导致患者用药不规范、医生滥用抗结核药品、结核和其他病双重感染等多种问题。可见，在甘孜藏区，结核病仍然是主要的公共卫生问题之一。

本次研究结果表明，四川省甘孜藏族自治州146例MTB总耐药率为28.15%，低于全国第五次TB流行病学抽样调查结果（36.8%）^[4]。MTB的传播和耐药情况存在显著的地域性^[5]。相比于西安（31.7%）^[6]、贵州（34.5%）^[7]、成都（28.83%）^[8]这些周边地区，甘孜藏区MTB耐药监测结果较低，但高于重庆（14.9%）。

本研究对766例结核病患者的痰标本进行了结核分枝杆菌PCR鉴定及耐药性分析，旨在了解当地结核菌的耐药模式，为制定更有效的防治策略提供依据。异烟肼（INH）高耐药率在本研究中居于首位，这可能与抗结核策略中INH剂量不足有关。异烟肼作为一线抗结核药物，其疗效和安全性

已得到广泛认可。然而，低于有效剂量的 INH 使用会导致治疗失败，并增加耐药菌株的出现。甘孜州地处高海拔地区，其独特的地理环境和人群特点可能影响 INH 的药代动力学，导致药物吸收和代谢的差异。此外，患者依从性差、不规范的治疗方案以及药物质量问题等因素也可能导致 INH 实际剂量低于有效剂量。为了降低 INH 耐药率，需要采取多种干预措施，包括：第一，优化治疗方案，确保患者接受足量、规范的 INH 治疗；第二，加强患者的健康教育，提高治疗依从性；第三，定期监测 INH 血药浓度，根据个体差异调整用药剂量；第四，加强药品质量监管，确保患者使用高质量的 INH 药物；第五，结合其他一线抗结核药物进行联合治疗，避免单药治疗；第六，加强对耐药结核病的监测和报告，及时发现和控制耐药菌株的传播。通过这些措施，可以有效降低 INH 耐药率，提高结核病的治愈率，最终控制结核病的流行。该地区 INH 的高耐药率提醒我们需小心仅用 INH 防治 MTB 的潜伏感染。已有研究发现，不规范给药、间断治疗、私自停药等因素会使 MTB 发生基因突变而产生获得性耐药。由于抗结核药物治疗时间延长，使 MTB 发生耐药的几率提高^[8]。因此，在对 TB 进行治疗时，需根据此地区的耐药情况及病人的病史等各方面可能影响因素，然后参照我国最新《耐药结核病化学治疗指南》^[9]用药。

研究结果提示，及时对核心抗结核药品进行耐药检测至关重要。对于初治患者，应尽早开展一线抗结核药物（如异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇）的耐药检测，以便及时调整治疗方案，避免治疗失败和耐药菌株的传播。对于复治患者，更需要进行全面的耐药谱检测，包括对二线抗结核药物的耐药性评估，以指导个体化治疗方案的制定。同时，积极开发新的敏感性高的抗结核药物也是刻不容缓的任务。面对日益严峻的耐药形势，新型抗结核药物的研发对于控制结核病疫情至关重要。此外，加强基层医疗机构的实验室建设和人员培训，提高耐药检测能力，对于在甘孜藏区有效控制结核病的传播也具有重要意义。

快速准确的菌种分离鉴定技术，也是防治结核病的关键。传统的痰培养方法可能存在误诊，以至于用药错误，使 MTB 容易产生耐药^[10]。快速分离培养出 MTB 并及时获得药敏试验结果，特别是对 INH、RFP 的药敏试验结果，在这些不发达的甘孜藏区地区极其重要。结合本次分析，PCR 技术具有灵敏度高、特异性强、检测速度快等优势，相比传统的培养方法，可以显著缩短检测时间，更快地明确诊断，从而使患者能够尽早接受规范的抗结核治疗，降低传播风险。尤其是在甘孜州这类高海拔地区，医疗资源相对匮乏，快速诊断技术更显得尤为重要。本研究中 PCR 技术的应用，有助于及时了解当地结核分枝杆菌的流行情况及耐药状况，为制定更

有效的结核病防控策略提供科学依据。未来，可以结合基因测序技术等更先进的分子生物学方法，对结核分枝杆菌进行更深入的研究，例如菌株的基因型、毒力因子、传播途径等，以期进一步优化诊断和治疗方案，并为开发新型抗结核药物和疫苗提供新的思路。

综上所述，研究发现，异烟肼（INH）的耐药率最高，可能与治疗中 INH 剂量不足、患者依从性差、高海拔地区特殊的药代动力学以及不规范的治疗方案等因素有关。此外，其他一线抗结核药物，如利福平、链霉素等也存在不同程度的耐药。多药耐药和广泛耐药结核病的检出率也较高，提示了耐药结核病控制的挑战。该研究结果强调了在甘孜藏区开展结核病耐药监测的重要性，并提示需要采取更有效的干预措施。在甘孜藏区 TB 患者痰结核菌耐药模式上，及时对核心抗结核药品行耐药检测，开发新的敏感性高的抗结核药，对阻断 MDR-TB 的传播有重大意义。

[参考文献]

- [1] 徐彩红, 赵雁林. 从《2020 年全球结核病报告》看我国结核病防治工作[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(7): 392-397.
- [2] 王宇. 全国第五次结核病流行病学抽样调查资料汇编[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2011: 15-18.
- [3] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 13-56.
- [4] 罗骝, 叶飞, 罗涛, 等. 成都市结核分枝杆菌耐药状况分析[J]. 华西医学, 2010, 25(10): 1854-1856.
- [5] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2019 年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 107-125.
- [6] 张选民, 刘志广, 曾令城, 等. 西安市结核分枝杆菌耐药性初步调查[J]. 疾病监测, 2008, 23(10): 637-639.
- [7] 袁薇, 周华, 张铭. 200 株结核分枝杆菌药敏试验结果分析[J]. 贵州医药, 2006, 30(2): 168-169.
- [8] 尚园园, 初乃惠. 肺结核患者氯法齐明耐药情况分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44(3): 225-229.
- [9] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2019 年)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 107-125.
- [10] 胡昌弟, 余旭良, 金菊仙, 等. 三种方法检测涂阴肺结核患者痰液和灌洗液结核分枝杆菌结果分析[J]. 中国预防医学杂志, 2019, 20(4): 294-297.

作者简介:

张煜(1988.03-), 男, 藏族, 四川甘孜州炉霍县人, 本科, 副主任检验技师, 研究方向为医学检验、微生物检验、公共卫生。