

- [2] 侯可可,张娜,李桃,等. 新型冠状病毒肺炎不同时期 CT 表现及中性粒细胞/淋巴细胞比值、T 淋巴细胞亚群变化[J]. 放射学实践,2020,35(3):272-276.
- [3] 李泉,聂珂,乔正荣,等. 淋巴细胞亚群在新型冠状病毒肺炎患者外周血中的表达及临床意义[J/OL]. 国际检验医学杂志,2020(2020-03-05)[2020-03-22]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1176.R.20200305.1440.002.html.
- [4] 李建国,陈瑞,魏菁. SARS 患者急性期外周血 CD3⁺、CD4⁺及 CD8⁺细胞数量的变化[J]. 免疫学杂志,2004,20(5):382-384.
- [5] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature,2020,579(7798):270-273.
- [6] 李泉,张浩,邓斯予,等. COVID-19 恢复期病毒核酸检测复阳与阴性患者淋巴细胞亚群及形态学特征比较研究[J/OL]. 重庆医学,2020(2020-04-03)[2020-04-05]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200402.1901.010.html.

(收稿日期:2020-04-06 修回日期:2020-04-07)

• 案例分析 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.20.050

1 例利福平 rpoB 基因多个位点缺失引起的耐药分析*

王明栋¹,秦 万^{1△},夏凤琼²,欧维正¹,张 娟¹,徐 勇¹,杨儒斌¹

1. 贵州省贵阳市公共卫生救治中心检验科,贵州贵阳 550003;2. 贵州省骨科医院检验科,贵州贵阳 550004

关键词: rpoB 基因; 位点缺失; 耐药; 利福平
中图法分类号: R521 **文献标志码:** C

文章编号: 1672-9455(2020)20-3065-03

耐药结核病的流行使当前结核病的控制工作面临着严峻的挑战。研究发现,结核病初治耐药的形成本一方面与结核分枝杆菌的基因变异有关,另一方面是健康人被复治的耐药患者携带的结核分枝杆菌感染所致,而复治耐药结核病患者的出现则与用药史有很大关系^[1]。利福平通过与由 rpoB 基因编码的 RNA 聚合酶亚基特异性结合,阻断结核分枝杆菌 RNA 的合成,导致结核分枝杆菌的死亡^[2],从而达到治疗目的。rpoB 基因在结核分枝杆菌基因组中只有 1 个拷贝,它含有 3 534 bp 的开放读码框,当 507~533 位 27 个氨基酸密码子的 81 个碱基的 RRDR 区发生突变(包括点突变或短的插入、缺失突变等)时,使 DNA 依赖的 RNA 聚合酶活性下降,利福平与 RNA 聚合酶亚单位结合力减弱,从而发生细菌对利福平的耐药^[3]。有关报道,95% 或更高比例的利福平耐药株的 rpoB 基因突变位于此区域^[4]。贵阳市公共卫生救治中心于 2019 年 1 月 26 日收治 1 例肺结核复治病例,痰液核酸检测结果为结核分枝杆菌阳性,然后进行耐药基因芯片扫描检测 rpoB 基因,显示为 511 位点信号值极低、513 位点和 516 位点无信号值,高度怀疑为缺失,异烟肼结果敏感。为进一步明确 rpoB 基因是否存在多个位点缺失,本研究进行第一代基因测序,现就患者出现的 rpoB 基因多位点缺失及治疗欠佳的原因进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,男,19 岁,厨师,身高 172 cm,

体质量 49 kg,近 1 年来体质量明显减轻。主诉:间断咳嗽 1 年,再发 7 个月,加重 1 个月。患者出生并生活于原籍,近期未到过其他疫区。既往有吸烟史 3 年,每天至少 40 支,现已戒烟近 1 年;既往有饮酒史 3 年,以啤酒为主,每周 3~4 次,每次 4~6 瓶,已戒酒近 1 年。1 年前患者无明显诱因出现咳嗽,呈阵发性,咳少许黄白色黏液痰,偶有间断痰血,痰多血少、色鲜红,伴乏力、食欲缺乏、盗汗、活动后气促气喘,平路步行 100 m 感气促气喘。初期以“感冒”治疗,无效后于当地医院诊断为肺结核,予瓶装异烟肼、利福平、吡嗪酰胺及乙胺丁醇(HRZE)抗结核治疗 1 个月后症状明显好转,便自行停药。7 个月前患者无明显诱因再次出现以上症状且有加重情况,故又到当地医院就诊,完善相关检查后诊断为肺结核复治,仍以上述抗结核药物治疗,但咳嗽、咳痰症状易反复,呈逐渐加重趋势,咳嗽剧烈及深呼吸时感双侧胸痛,呈阵发性钝痛,以右侧为主。患者再一次就诊于当地医院,怀疑为耐药肺结核,后转入贵阳市公共卫生救治中心治疗。利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术(Gene Xpert MTB/RIF)检出痰液中有结核分枝杆菌并对利福平耐药,故以耐药肺结核收治于结核科。实验室检查:血生化腺苷脱氨酶(ADA)为 28.7 U/L;结核抗体 IgG 阳性;红细胞沉降率 28 mm/h。B 超:右侧胸腔少量包裹性积液。胸部 CT:右侧胸廓塌陷,右侧胸壁见宽基底弧形影,内见液平面形成,边缘清,局部见胸膜反应;右上叶支气管壁增宽、增厚呈“双轨征”。病

* 基金项目:贵州省贵阳市科技计划项目(筑科合同[2018]1-41 号)。

△ 通信作者, E-mail: qinwanhwm@163.com。

原菌检查;痰抗酸染色阳性;分枝杆菌核酸检测阳性。入院治疗 8 d 后临床症状稍有好转,但因经济原因患者要求出院。后期追踪出院 6 个月服药及治疗情况:结核临床症状仍有,药物治疗欠佳。

1.2 仪器与试剂 DNA 微阵列芯片试剂由北京博奥生物技术有限公司提供;10% NaOH 液化液由 PCR 实验室自配;ExtractorTM 36 核酸快速提取仪, BioMierTM II 芯片杂交仪, SlidewasherTM 8 芯片洗干仪和 LuxScan-10K/B 微阵列芯片扫描仪均由北京博奥生物技术有限公司提供;95 °C K30 干式恒温仪由上海之信仪器有限公司提供;BY-G18 型医用高速离心机由北京白洋淀医疗器械有限公司提供;TC-96/G/H (b) 基因扩增仪由杭州博日科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 DNA 微阵列芯片法 DNA 微阵列芯片法检测指标包括利福平及异烟肼的 3 个耐药相关基因 rpoB 基因、katG 基因、inhA 基因启动子的野生型及不同突变型。其中对于利福平耐药相关基因 rpoB 基因检测 6 个位点,以及 531 位 TCG→TTG、531 位 TCG→TGG、526 位 CAC→GAC、526 位 CAC→TAC、526 位 CAC→CTC、526 位 CAC→CGC、511 位 CTG→CCG、513 位 CAA→CCA、513 位 CAA→AAA、516 位 GAC→GTC、516 位 GAC→TAC、516 位 GAC→GGC 及 533 位 CTG→CCG 这 13 种突变型。对于异烟肼耐药相关基因 katG 基因及 inhA 基因启动子各检测 1 个位点,分别为 katG 基因 315 位 AGC→ACC 和 AGC→AAC 两个突变型,inhA 基因启动子 15 位 C→T 突变型。

1.3.2 罗氏培养 接种后的改良罗氏培养基置于 37 °C 培养 5~8 周,每周观察 1 次细菌的生长状态直至有菌落生长到对数生长期(细菌生长最旺盛时期)为佳。

1.3.3 表型药敏试验 本研究采用表型药敏试验(比例法),按照中国防痨协会基础专业委员会制订的《结核病诊断实验室检验规程》^[5]进行试验。

2 结果

2.1 DNA 微阵列芯片法测序结果 将 DNA 微阵列芯片法扫描判读结果为疑似 rpoB 基因多个位点缺失(rpoB 511、513 与 516)的标本包装后送至北京博奥生物技术有限公司进行 rpoB 基因一代测序,结果显示为 513~516 位点缺失,其中 513 位点的碱基 AA 缺失,514 位点的碱基 TTC 缺失,515 位点的碱基 ATG 缺失,516 位点的碱基 G 缺失。同时发现在第 190~242 个碱基有 1 个碱基也出现缺失,这可能与耐药相关位点无关。异烟肼扫描结果判读为敏感。

2.2 罗氏培养与药敏试验结果 送检了清晨痰进行结核分枝杆菌培养(罗氏培养),结果为阳性。菌株的表型药敏试验(比例法)结果为对利福平(4.0 μg/mL)和异烟肼(0.4 μg/mL)耐药,对链霉素(10.0 μg/mL)、乙

胺丁醇(2.0 μg/mL)、氧氟沙星(2.0 μg/mL)和卡那霉素(10.0 μg/mL)均敏感。

3 讨论

为了验证利福平 rpoB 基因多个位点的缺失对利福平耐药程度的影响,对该菌株进行了表型药敏试验(比例法),结果显示,其对利福平(4.0 μg/mL)和异烟肼(0.4 μg/mL)耐药,其余均敏感,但值得一提的是,耐药菌株生长缓慢,这就证实了耐药基因缺失而导致利福平不同程度的耐药。同时利福平 rpoB 基因多个位点的缺失也会影响其他抗结核药的耐药性,故导致耐药菌株生长缓慢,这可能是低耐药性的表现。李敏等^[6]报道,rpoB 基因不同位点的突变导致的耐药水平是不同的。而本研究主要通过利福平 rpoB 基因测序后证实患者对利福平耐药是由于 rpoB 基因的 513~516 位点的缺失,其中 513 位点及 516 位点是利福平耐药的相关位点,这几个位点的缺失是导致利福平不同程度耐药的原因,然而是否会导致其他抗结核药的不同程度耐药还需要大样本的研究证实。但就本案例的治疗情况来看,利福平 rpoB 基因这几个位点的缺失可能导致其他抗结核药耐药,从而导致治疗效果欠佳。

本研究中患者出现耐药基因缺失而导致不同程度耐药性的可能因素为该患者职业为厨师,经常吸入油烟,这在一定程度上加重了肺清除功能的负荷,给了结核分枝杆菌感染的机会,同时患者有饮用啤酒史而且吸烟量比较大。吸烟是肺结核发病的危险因素,吸烟者肺结核发病风险是非吸烟者的 5 倍^[7]。以上这些因素可导致患者免疫力的降低,在被结核分枝杆菌感染后有可能发生 rpoB 基因位点缺失。复治患者是指因结核病不合理或不规律治疗超过 1 个月的患者、初治失败和复发患者。该患者于 1 年前便出现肺结核的症状,并被当地医院诊断为肺结核,后给予瓶装 HRZE 抗结核治疗 1 个月后症状明显好转,于是患者便自行停药,但在数月后,患者又出现了原有症状且有加重趋势,在继续给予 HRZE 抗结核治疗无效的情况下才就诊。该例患者依从性差,这种不遵医嘱的服药方式也有可能是导致耐药的原因,或者也是耐药基因突变及位点缺失的原因。这与袁磊凌等^[1]报道的佛山市涂阳肺结核患者耐药情况分析中的耐药因素相符。全国第 5 次结核病流行病学调查显示,我国西部地区的肺结核患病率明显高于中、东部地区,贵州省是经济欠发达的西部省份,疫情严重^[8]。患者生活于高疫情的环境下,其也有可能是被因基因位点缺失而产生耐药菌株的其他患者传染所致。

DNA 微阵列芯片法检查结果显示,异烟肼敏感,而表型药敏试验(比例法)中异烟肼结果为耐药。对于结果不一致的可能原因如下:(1)结核分枝杆菌表型药敏试验(比例法)是通过对比、观察结核分枝杆菌在含药和不含药的培养基中的生长情况来检测其耐

药性,而 DNA 微阵列芯片法中只有部分抗结核药物特异的耐药相关突变基因被发现,目前的耐药基因检测试剂也只能检测已发现的抗结核药物主要耐药基因型。(2)DNA 微阵列芯片法无法确定标本中耐药细菌的比例,可能难以检出野生型和突变型菌株混合形成的异质性耐药(即从患者体内同时分离出敏感菌株和耐药菌株的现象),也可能无法检出表型药敏试验耐药水平的耐药菌株。(3)与异烟肼耐药相关的 katG 基因和 inhA 基因启动子存在其他未知的耐药相关位点。

综上所述,对于药物治疗效果欠佳或失败的肺结核患者,广大医务人员应高度重视,随时监测药物敏感性,同时还要注意类似基因突变或缺失而导致的其他抗结核药耐药。对于依从性差者,医务人员及家属要加强监督管理,确保患者在整个治疗过程中规律用药。

参考文献

- [1] 袁磊凌,李家政,邹远华,等. 佛山市涂阳肺结核患者耐药情况分析[J]. 结核病与肺部健康杂志,2014,3(1):40-45.
- [2] 胡族琼. 结核分枝杆菌 rpoB 基因突变特征与利福平耐药水平关系的研究[J]. 中国人兽共患病学报,2016,32(1):

39-50.

- [3] 曹翌明. 中国结核分枝杆菌利福平耐药株 rpoB 基因 531、526、516 位点碱基突变特点[J]. 现代医学,2015,15(1):7-12.
- [4] OCHERETINA O, ESCUYER V E, MABOU M M, et al. Correlation between genotypic and phenotypic testing for resistance to rifampin in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Haiti: investigation of cases with discrepant susceptibility results[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90569.
- [5] 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.
- [6] 李敏,李大兴,杨奇,等. 结核分枝杆菌利福平分子药敏结果与其表型药敏差异的研究[J]. 实用预防医学,2019,26(1):46-50.
- [7] 文学,张先明,唐静,等. 贵阳地区肺结核影响因素的病例分析[J]. 贵州医科大学学报,2017,42(3):337-340.
- [8] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.

(收稿日期:2020-01-26 修回日期:2020-05-16)

• 案例分析 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.20.051

百日咳患儿外周血涂片发现裂隙淋巴细胞 1 例*

卢 峥¹, 罗 飞¹, 兰礼节¹, 曾丽芬¹, 欧阳青丹¹, 姚胜国¹, 卢志威^{2△}

1. 广西壮族自治区百色市凌云县人民医院儿科, 广西百色 533100; 2. 广东省深圳市儿童医院呼吸科, 广东深圳 518026

关键词:百日咳; 儿童; 裂隙淋巴细胞

中图法分类号:R725.6

文献标志码:C

文章编号:1672-9455(2020)20-3067-02

百日咳是儿科常见的呼吸道传染病,在广泛接种百日咳疫苗前,其病死率较高。自从百白破联合疫苗推广以来,其发病率和病死率大幅下降。但最近全球百日咳发病出现反弹,称之为“百日咳再现”^[1],成为全球关注的卫生问题,这对百日咳的诊断提出了新的挑战。本文就凌云县人民医院接诊的 1 例百日咳患儿外周血涂片发现裂隙淋巴细胞进行报道。

1 病例资料

1.1 入院情况 患儿,女,8 个月,因“咳嗽 2 d,发热 1 d”于 2019 年 5 月 9 日 14:44 入住凌云县人民医院儿科。患儿于入院前 2 d 无明显诱因出现咳嗽,呈阵发性连声咳,伴吸气末鸡鸣样回音,无气促。1 d 前发热,体温最高 39 °C,无烦躁不安、抽搐。随后到该院门诊就诊,门诊以“支气管炎”收入儿科。预防接种

史:按时正常接种。接触史:近期有接触正在咳嗽的母亲和奶奶。否认家中有结核病史。入院查体:体温 38.6 °C,脉搏 116 次/分,呼吸 30 次/分,神清,精神可,双肺呼吸音粗,可闻及少量痰鸣音,心率 116 次/分,律齐,未闻及杂音,腹软,未扪及包块,肠鸣音正常,四肢活动可,神经系统查体无异常。辅助检查:白细胞计数 $35.66 \times 10^9/L$ 、淋巴细胞计数 $28.18 \times 10^9/L$ 、血红蛋白 113.00 g/L、血小板计数 $652.00 \times 10^9/L$ 、超敏 C 反应蛋白 3.72 mg/L、降钙素原 0.55 ng/mL,痰培养为阴沟肠杆菌,对多种头孢类抗菌药物均敏感。呼吸道病原五项均为阴性。心肌酶、肝肾功能、电解质、凝血四项、体液免疫未见异常。胸片:两肺、心膈未见异常。血涂片镜下可见白细胞增多,以淋巴细胞为主,可见裂隙淋巴细胞(3.5%),血

* 基金项目:广东省深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201512030)。

△ 通信作者, E-mail: luzhiwei1950@163.com。