

# 锁环探针荧光定量PCR技术检测结核分枝杆菌耐药性及耐药突变基因的应用研究

朱秀兰, 邓玉玲, 莫丽英, 蒲荣, 陈凤钻, 韦学武, 卢雪茹, 张帅  
(广东医科大学附属东莞松山湖中心医院检验科, 广东东莞 523000)

**摘要:**目的 分析锁环探针荧光定量PCR技术检测结核分枝杆菌(MTB)耐药性及耐药突变基因的临床应用价值。方法 收集2021年1月~2024年5月广东医科大学附属东莞松山湖中心医院165例涂阳肺结核患者痰液标本,均行痰涂片镜检、MTB培养/鉴定、比例法药敏试验及基于锁环探针的荧光定量PCR技术检测利福平(RFP)、异烟肼(INH)耐药性及耐药基因突变位点。以比例法药敏试验结果为参考标准,评价锁环探针荧光定量PCR技术检测耐药MTB的效能。结果 经分离培养证实151株为MTB,比例法药敏试验检出RFP耐药36株,INH耐药42株。锁环探针荧光定量PCR技术检出RFP、INH耐药,与比例法药敏试验检测结果差异无统计学意义( $\chi^2=0.018, 0.067$ , 均 $P>0.05$ )。以药敏试验为参考,锁环探针荧光定量PCR技术检测RFP耐药的敏感度、特异度、准确度分别为91.67%(33/36)、98.26%(113/115)、96.69%(146/151),检测一致性Kappa值为0.895;检测INH耐药的敏感度、特异度、准确度分别为83.33%(35/42)、95.41%(104/109)、92.05%(139/151),检测一致性Kappa值为0.867。锁环探针荧光定量PCR技术检出RFP耐药菌株rpoB基因突变中96.97%为单一位点突变,以531位点突变为约占57.58%,其次为526位点突变约占27.27%;检出INH耐药菌株katG/INH A基因突变,以katG 315位点突变为占,其中80.56%为katG单一位点突变,16.67%为INH A单一位点突变。结论 涂阳肺结核患者应用锁环探针荧光定量PCR技术行痰标本RFP、INH耐药筛查具有较高的诊断效能,可作为临床快速诊断耐药基因位点突变及筛查耐药结核病的补充手段,为临床诊疗提供依据。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 锁环探针; 荧光定量PCR技术; 利福平; 异烟肼; 耐药性; 耐药基因突变  
**中图分类号:** R378.911; Q754; Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)01-111-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.01.021

## Application Research of Lock-loop Probe Fluorescence Quantitative PCR Technology for Detecting Drug Resistance and Resistance Mutation Genes in *Mycobacterium Tuberculosis*

ZHU Xiulan, DENG Yuling, MO Liying, PU Rong, CHEN Fengzuan, WEI Xuewu, LU Xueru, ZHANG Shuai  
(Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Dongguan Songshan Lake Central Hospital, Guangdong Medical University, Guangdong Dongguan 523000, China)

**Abstract: Objective** To analyze the clinical application value of lock-loop probe fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) technology for detecting drug resistance and drug resistance mutation genes of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). **Methods** Sputum samples from 165 smear-positive pulmonary tuberculosis patients admitted to Dongguan Songshan Lake Central Hospital Affiliated to Guangdong Medical University from January 2021 to May 2024 were collected. Sputum smear microscopy, MTB culture/identification, proportional drug sensitivity test and fluorescent quantitative PCR based on lock-loop probe were used to detect Rifampicin(RFP) and Isoniazid(INH) resistance and gene mutation sites. The efficacy of fluorescent quantitative PCR based on lock-loop probe in detecting drug-resistant MTB was evaluated using proportional drug susceptibility testing results as the reference standard. **Results** After isolation and culture, 151 strains were confirmed as MTB. RFP resistant 36 strains and INH resistant 42 strains were detected by proportional susceptibility test. The detection of RFP and INH resistance by the lock-loop probe fluorescence quantitative PCR showed no significant differences compared with the proportional method ( $\chi^2=0.018, 0.067$ , all  $P>0.05$ ). Using the drug sensitivity test as a reference, the sensitivity, specificity and accuracy of the lock-loop probe fluorescent quantitative PCR technique for detecting RFP resistance were 91.67% (33/36), 98.26% (113/115) and 96.69% (146/151), respectively, and the Kappa value for detection consistency was 0.895. The sensitivity, specificity and accuracy of INH resistance detection were 83.33% (35/42), 95.41% (104/109) and 92.05% (139/151), respectively, with a consistency Kappa value of 0.867. The rpoB gene mutations in RFP resistant strains were detected by lock-loop probe fluorescence

**基金项目:** 东莞市社会发展科技面上项目(编号: 20231800937402)。

**作者简介:** 朱秀兰(1973-), 女, 本科, 主任技师, 研究方向: 微生物检验, E-mail: fjdugv@sina.com。

quantitative PCR, with 96.97% being single locus mutations. Mutations at 531 locus were predominant (approximately 57.58%) followed by those at 526 locus (approximately 27.27%). Detection of katG/INH A gene mutations in INH resistant strains revealed katG mutation at 315 locus as predominant, with 80.56% being katG single site mutations and 16.67% being INH A single-site mutations. **Conclusions** The application of lock-loop probe fluorescence quantitative PCR technology for screening RFP and INH resistance in sputum specimens from smear-positive pulmonary tuberculosis patients has a high diagnostic efficiency. It can be used as a supplementary tool for the rapid clinical diagnosis of drug-resistant gene mutations and the screening of drug-resistant tuberculosis, providing evidence for clinical diagnosis and treatment.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; lock-loop probe; fluorescence quantitative PCR technique; Rifampin; Isoniazid; drug resistance; drug resistance gene mutation

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染所引起的一种影响人类健康的慢性传染病,随着耐多药和广泛耐药结核菌的出现,该疾病的控制变得复杂<sup>[1]</sup>。利福平(Rifampicin, RFP)和异烟肼(Isoniazid, INH)是结核病治疗重要的一线抗结核药物,研究发现95%的RFP抗性突变存在于rpoB基因中,而INH抗性突变主要存在于katG/INH A基因中,上述基因发生突变可引起MTB对RFP和INH耐药<sup>[2-3]</sup>。因此开展灵敏且有效的耐药MTB检测方法,对于指导临床选择有效的抗结核药物,防止耐药MTB的产生和传播非常重要。锁环探针是新开发的一种探针,其两端与特异性靶核酸序列互补,3'端设计有突变单碱基区,在连接酶作用下可连接环化并作为扩增模板,通过扩增与靶核酸杂交连接并环化的探针,可检测相应扩增信号,当探针与靶核酸存在错配时则无法进一步连接并环化,因而保证了检测的高特异性<sup>[4-6]</sup>。荧光定量PCR是广泛用于实验室病原体快速检测的一种方法,为临床诊断MTB耐药提供了可靠依据<sup>[7]</sup>。锁环探针荧光定量PCR技术利用锁环探针连接特性检测位点突变,利用荧光定量PCR技术实现信号扩增放大,用于人类疾病相关基因突变位点检测,其灵敏度高、特异性好且操作简单、快速,是一种有效的检测方法。经检索中外文献发现,该技术在检测MTB耐药中的应用报道有限,所以本研究探讨了锁环探针荧光定量PCR技术检测MTB耐药性及耐药突变基因的应用价值,现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性选取2021年1月~2024年5月在广东医科大学附属东莞松山湖中心医院就诊的165例涂阳肺结核患者作为研究对象,经分离培养证实151例为MTB感染,其中男性85例、女性66例,平均年龄 $45.12 \pm 5.89$ 岁。纳入标准:①初治患者,年龄>18岁;②符合《肺结核诊疗指南》<sup>[8]</sup>中关于肺结核诊断标准,且痰涂片阳性;③无重要脏器功能障碍;④资料完整,均接受痰涂片镜检、MTB培养/鉴定、药敏试验及锁环探针荧光定量PCR技术检测。排除标准:①对本研究药物过敏者;②标本污染及非

肺结核;③存在免疫功能障碍、造血系统功能障碍;④合并肿瘤者。本研究通过医院伦理委员会批准(伦理批号20240712),患者及其家属均知情同意。

1.2 仪器和试剂 Bactec MIGHT960全自动分枝杆菌培养仪、痰标本处理液(美国BD); PNB/TCH培养液、抗酸染液(珠海贝索生物技术公司); PCR扩增反应所需试剂 Taq DNA连接酶、核酸外切酶I/III、引物及锁环探针(大连宝生物工程有限公司); PCR扩增仪(美国BioRad公司); MTB核酸提取试剂(北京博奥生物科技有限公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 痰涂片镜检: 留取所有患者晨痰标本5ml,放入无菌容器2h内送检。将待测痰液标本涂片,进行抗酸染色,干燥后镜检。油镜下观察300个视野,抗酸杆菌菌数1~8条判定为阴性,100个视野3~9条(+),10个视野1~9条(++),1个视野1~9条(+++),1个视野 $\geq 10$ 条(++++)。

1.3.2 MTB分离培养、菌种鉴定: 经痰涂片证实为阳性的痰液标本,加入4%(v/v)的NaOH溶液(1~2倍体积)振荡混匀进行液化,室温放置15min,弃上清,无菌条件下加入0.5ml营养剂和0.1ml抗菌素混合液,再加入0.5ml处理好的标本,混合后放入全自动分枝杆菌培养仪进行培养,阳性标本通过涂片抗酸染色镜检确认,同时采用传统对硝基苯甲酸(p-Nitrobenzoic acid, PNB)、噻吩-2-羧酸酰肼(Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, TCH)培养液进行MTB鉴定,以PNB培养液无菌落生长和TCH培养液有菌落生长判定为MTB,否则为非MTB。

1.3.3 比例法药敏实验: 参照结核病实验室检测相关规程对培养阳性菌株分别进行RFP和INH比例法药敏实验,将待测菌株制成1mg/ml菌悬液,加入灭菌生理盐水进行稀释,浓度为 $10^2$ mg/ml,用接种环取1满环菌液,通过划线法将其接种到对照及含 $40 \mu\text{g/ml}$  RFP和 $0.2 \mu\text{g/ml}$  INH的培养基表面,37℃孵育4周观察记录菌落生长情况,计算耐药百分比, $>1\%$ 表示耐药, $\leq 1\%$ 表示敏感。

1.3.4 锁环探针荧光定量PCR检测耐药性及耐药基因: ①锁环探针及扩增引物设计合成: 于Genbank

检索MTB rpoB基因(覆盖81bp RFP耐药决定区)和INH耐药katG/INH A基因(覆盖katG基因315密码子突变, INH A启动子区-17~-8位点)序列, 根据基因序列和突变位点信息, 使用Primer5.0软件设计PCR扩增引物及检测位点所需锁环探针, 人工合成野生型和突变型模板, 锁环探针及扩增引物序列见表1。②锁环探针连接环化及酶切消化: 反应体系10 μl, 锁环探针1 μl, 人工合成模板1 μl, 10 × Taq DNA连接酶缓冲液1 μl, ddH<sub>2</sub>O 6.85 μl, 95℃ 5min, 加入40U/μl Taq DNA连接酶0.15 μl, 65℃ 1h, 95℃ 15min, 水浴5min后向上述反应液中加入试验所需酶切反应液10 μl, 37℃ 3h, 80℃ 20min。③DNA的提取: 吸取痰液标本1ml加入离心管内, 再加入2ml的N-乙酰-L-半胱氨酸(NALC) -NaOH处理液震荡混匀, 13 000r/min离心10min, 弃上清, 加入PBS液

1ml进行重悬, 13 000r/min离心弃上清, 在沉淀中加入DNA提取液, 90℃加热10min, 再次离心1min, 吸取上清液, 得到MTB DNA。④qPCR反应: 配制PCR反应体系20 μl, 2 × Probe qPCR Master Mix 10 μl, 野生型和突变型锁环探针各0.5 μl, 上下游引物各1 μl, DNA模板1.5 μl, Taq DNA连接酶1 μl, ddH<sub>2</sub>O补至20 μl, 使用荧光定量PCR仪扩增rpoB及katG/INH A基因, 95℃ 10min, 95℃ 20s, 60℃ 1min, 45个循环。锁环探针荧光定量PCR采用配套标准试剂盒行耐药基因突变位点检测, 以Ct ≤ 35为存在突变位点和相应耐药性, Ct > 38则为野生型不具备耐药性, 当35 < Ct ≤ 38时重复检测分析, 若仍处于此区间且曲线呈标准“S”型并且有明显指数增长期, 则为突变型, 反之为野生型。

表1 锁环探针及扩增引物序列

基因	项目	核苷酸序列	
rpoB	锁环探针	5'-ACGTCAGGTTGCGCTTCGCAATAATTCACGACCATGTTGGTAGTATTCCATACGCATCCAAGTC-3'	
	引物1	5'-AGATTGCTTAGAATGG-3'	
	引物2	5'-TTAATTCGTCCTAGCA-3'	
	野生型模板	5'-GTGGTACACAACAGCCGACGCTGTGCGGGGCTGCCGG-3'	
	突变型模板	5'-GTGGTACACAAGTCCGACGCTGTTGGCGGGCTGCCGG-3'	
	katG	锁环探针	5'-CCATCAAGCTGCCATGCAACCTTCTGTGCTGATCTA-3'
katG	引物1	5'-CAGCCGCGTGAAAATGGTGT-3'	
	引物2	5'-ACGCACAAGTGCAGCATTAC-3'	
	野生型模板	5'-TGAACGCCGAGGTACCAGCACCGGGGCTACTCAACGCGAGGTATGCGTGACAAG-3'	
	突变型模板	5'-TGAACGCCAAGGTACCAGCACCGGGGCTACTCAACGCGAGGTATGCGTGACAAG-3'	
	INH A	锁环探针	5'-CAATAGCACCGTACATAGTCGGACGTCTAGGAAGGAGGC-3'
		引物1	5'-TCGTTACCCAAACGCGATGG-3'
引物2		5'-CAGACAATACCTAGCAGATC-3'	
野生型模板		5'-GCTGCGGTAGTACCACCCTCCGGAACCAGGAGGACTCCGCT-3'	
突变型模板		5'-GCTGCGGTAGTACCACCCTCCGGAACCAGGAGGACTCCGCT-3'	

1.4 统计学分析 采用SPSS 25.0软件进行数据统计分析。计量资料以n(%)表示, 比较采用χ<sup>2</sup>检验; 以比例法药敏试验结果为参考标准, 计算锁环探针荧光定量PCR技术的检验效能, 检测结果一致性采用Kappa分析。P < 0.05为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 比例法药敏试验结果 165株抗酸阳性菌, 经最终证实151株为MTB复合群, 比例法药敏检出12株(7.95%)为RFP单耐药, 18株(11.92%)为INH

单耐药, 24株(15.89%)为两者同时耐药, 其余97株(64.24%)为敏感菌株。

2.2 锁环探针荧光定量PCR技术检测RFP、INH耐药效能 见表2。锁环探针荧光定量PCR技术检出35株(23.18%)RFP耐药, 40株(26.49%)INH耐药, 与比例法药敏试验检测结果差异无统计学意义(χ<sup>2</sup> = 0.018、0.067, 均P > 0.05)。以比例法药敏试验结果为准, 锁环探针荧光定量PCR技术检测RFP耐药的敏感度、特异度、准确度分别为91.67%、98.26%、

96.69%，检测一致性Kappa值为0.895；检测INH耐药的敏感度、特异度、准确度分别为83.33%、95.41%、92.05%，检测一致性Kappa值为0.867。

2.3 锁环探针荧光定量PCR技术检测RFP耐药基因突变 见表3。锁环探针荧光定量PCR技术检出RFP耐药菌株中33株为rpoB基因突变，其中96.97%为单一位点突变，以531位点突变为主约占57.58%，其次为526位点突变约占27.27%，516位点突变占6.06%，513位点和511位点突变均占3.03%。

表2 锁环探针荧光定量PCR技术检测RFP、INH的耐药效能

药物	锁环探针荧光定量PCR	比例法		合计
		耐药	敏感	
RFP	耐药	33	2	35
	敏感	3	113	116
	合计	36	115	151
INH	耐药	35	5	40
	敏感	7	104	111
	合计	42	109	151

表3 锁环探针荧光定量PCR技术检测RFP耐药rpoB基因突变位点

rpoB 突变位点	密码子突变	株数	突变率 (%)
531	TCG-TTG	14	42.42
	TCG-TGG	5	15.15
516	GAC-GTC	1	3.03
	GAC-TAC	1	3.03
513	CAA-AAA	1	3.03
526	CAC-TAC	4	12.12
	CAC-GAC	1	3.03
	CAC-CTC	3	9.10
	CAC-CGC	1	3.03
511	CTG-CCG	1	3.03
513、516	CAA-AAA, GAC-GGC	1	3.03

2.4 锁环探针荧光定量PCR技术检测INH耐药基因突变 见表4。锁环探针荧光定量PCR技术检出INH耐药菌株中36株为katG/INH A基因突变，以katG 315单一位点突变为主约占80.56%，16.67%为INH A单一位点突变，2.78%为katG/INH A双位点突变。

表4 锁环探针荧光定量PCR技术检测INH耐药katG/INH A基因突变位点

基因	突变位点	密码子突变	株数	突变率 (%)
katG	315	AGC-AAC	11	30.56
		AGC-ACC	18	50.00
INH A	15	C-T	6	16.67
katG/INH A	315、15	AGC-ACC, C-T	1	2.78

### 3 讨论

随着耐药结核病的逐渐增多，全球结核病防控工作面临巨大挑战。耐药是结核病治疗难度增加的关键因素，而产生耐药的重要因素是基因发生突变，抗结核药物作用靶点及相关代谢酶的基因突变导致药物被降解及酶失活，使MTB对药物产生耐受性<sup>[9]</sup>。因此，早期快速检测耐药MTB及其基因突变情况，是防治耐药结核病的关键。建立新的快速准确检测耐药MTB基因突变的方法也是目前面临的迫切需求。

传统药敏试验是临床用于广泛诊断耐药结核的“金标准”，敏感度和特异度极高，但其诊断周期较长(4~8周)，时效性差，会延长无效治疗时间，不利于耐药结核病的防治<sup>[7]</sup>。分子生物学技术在耐药结核病快速诊断方面展现出良好优势，能有效减少检测时间且诊断效能较高，但其应用成本较高，限制临床推广应用。锁环探针是采用不对称方式设计的一种特殊的探针，其两端具有与靶基因的互补序列，通过锁环探针识别靶基因并结合形成不完全闭合的环状寡核苷酸，然后在连接酶作用下形成完全闭合环状寡核苷酸，检测特异度较高<sup>[4,8]</sup>。有研究将锁环探针与滚环扩增技术相结合用于MTB耐RFP rpoB基因突变检测，发现该方法敏感度高、特异度高，操作简单，可极大缩短检测时间<sup>[9]</sup>。近年陈章权等<sup>[10]</sup>学者建立了一种基于锁环探针的荧光定量PCR检测基因突变位点的方法，证实可实现SARS-COV2-Delta突变株的T478K突变位点、地中海贫血的CD17突变位点和MTB RFP耐药株rpoB基因531突变位点检测，为疾病相关基因突变快速检测开辟了新的视野。

本研究比例法药敏试验显示MTB中23.84%存在RFP耐药，27.82%存在INH耐药，两者都耐药较多见，与孙青等<sup>[11]</sup>学者报道一致。锁环探针荧光定量PCR检出RFP耐药率为23.18%，INH耐药率为26.49%，检测结果与药敏检测结果无差异，一致性大于0.8，且检测敏感度、特异度均较高，提示该技术对快速检测MTB耐药具有良好的诊断价值。该技术检测结果与药敏试验结果部分存在差异，药敏法耐药而锁环探针荧光定量PCR敏感分析的原因可能在于MTB耐药机制较为复杂，除位点突变外可能还

存在其他的耐药机制,如外排泵等<sup>[12-13]</sup>;培养法的检测限可达到1%,分子法的检测限一般在20%左右,可能存在异致性耐药<sup>[14]</sup>;分子法是针对特定突变位点的检测,可能未覆盖所有的突变位点;DNA提取效能有限,可能造成核酸浓度低于方法检测限,导致未能检测到突变位点存在<sup>[15-16]</sup>。药敏法敏感而锁环探针荧光定量PCR耐药的原因可能在于药敏法终浓度设置过高,本研究中RFP终浓度40 μg/ml,INH为0.2 μg/ml;体外培养可能导致耐药菌比例下降,检测敏感度降低<sup>[17]</sup>,上述因素的存在都可能导致实验过程中出现漏检或误检。对于检测结果不一致的患者,临床应引起重视,及时调整用药方案。

研究报道,MTB RFP耐药株约95%是由rpoB基因的81bp耐药区(507~533位密码子)突变决定,以531位点C-T突变频率最高;INH耐药株约50%以上发生在katG的315密码子,INH A启动子-15和-8位点碱基突变<sup>[2-3]</sup>。本研究检出RFP耐药株中rpoB基因突变以531位点(TCG-TTG)突变率最高,其次为526位点突变,与王丹吉等<sup>[18-19]</sup>报道相近;INH耐药株中katG/INH A基因突变约80.56%为katG单一位点突变,与SHAO等<sup>[19-20]</sup>报道的82.54%、78.57%INH耐药菌株为katG 315位点突变相近,而INH A单一位点突变仅为16.67%,表明锁环探针荧光定量PCR对RFP和INH常见突变耐药位点检测结果与文献报道的其他分子生物学技术相符。

综上所述,涂阳肺结核患者应用锁环探针荧光定量PCR技术行痰标本RFP、INH耐药筛查具有较高的诊断效能,可作为临床快速诊断耐药基因位点突变及筛查耐药结核病的补充手段,为临床诊疗提供依据。本研究仍有局限性,MTB耐药机制复杂,研究主要针对RFP、INH耐药性及对应rpoB基因、katG/INH A基因突变进行检测,对于其他突变位点未涵盖在内,这可能也是部分耐药株未检出耐药基因突变的主要原因;对与药敏试验检测结果不符合的菌株,未行进一步检测分析;目前锁环探针荧光定量PCR技术尚未普及,未增加其他分子生物学技术进行比较观察,其应用价值后续还需进一步研究验证。

#### 参考文献:

- [1] 张慧,赵雁林,严俊.我国结核病预防控制进展与挑战[J].中国预防医学杂志,2025,26(1):1-7.  
ZHANG H, ZHAO Y L, YAN J. Progress and challenges in tuberculosis prevention and control in China[J]. China Preventive Medicine, 2025, 26(1): 1-7.
- [2] GOOSSENS S N, SAMPSON S L, VAN RIE A. Mechanisms of drug-induced tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2020, 34(1): e00141-20.
- [3] POULTON N C, ROCK J M. Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in *Mycobacterium*

*tuberculosis* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2022, 12: 997283.

- [4] 夏珂,李梦雅,田晖艳,等.多色荧光探针的滚环扩增技术检测结核分枝杆菌耐药基因[J].中华预防医学杂志,2022,56(1):56-62.  
XIA K, LI M Y, TIAN H Y, et al. Detection of drug resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* by rolling circle amplification technique with multicolor fluorescent probes [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2022, 56(1): 56-62.
- [5] 丁磊,徐俊驰,邱文娜,等.结核分枝杆菌耐药机制和治疗的最新研究进展[J].现代检验医学杂志,2021,36(2):1-5,48.  
DING L, XU J C, QIU W N, et al. Latest research progress on the drug resistance mechanism and treatment of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(2): 1-5, 48.
- [6] 张江峰,张亚丽,曾照芳,等.利用滚环扩增技术快速检测结核分枝杆菌rpoB基因单碱基突变[J].第三军医大学学报,2013,35(20):2155-2158.  
ZHANG J F, ZHANG Y L, ZENG Z F, et al. Detection of rpoB single base mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by rolling circle amplification[J]. Journal of Third Military Medical University, 2013, 35(20): 2155-2158.
- [7] 刁婷婷,张红吉,欧阳兵,等.耐多药结核病实验室检测技术进展[J].检验医学与临床,2025,22(1):131-136.  
DIAO T T, ZHANG H J, OUYANG B, et al. Advances in laboratory detection techniques for multidrug-resistant tuberculosis[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2025, 22(1): 131-136.
- [8] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等.肺结核基层诊疗指南(2018年)[J].中华全科医师杂志,2019,18(8):709-717.  
Chinese Medical Association, Chinese Medical Journals Publishing House, Chinese Society of General Practice, et al. Guideline for primary care of pulmonary tuberculosis (2018)[J]. Chinese Journal of General Practitioners, 2019, 18(8): 709-717.
- [9] CHEN X Y, WANG B, YANG W, et al. Rolling circle amplification for direct detection of rpoB gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from clinical specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(5): 1540-1548.
- [10] 陈章权,佘东春,余路新,等.一种基于锁环探针的荧光定量PCR检测基因突变位点的试剂盒及检测方法:202310019274[P].广东省:CN115927573A,2023-04-07.  
CHEN Z Q, DIAN D C, YU L X, et al. A kit and detection method for detecting gene mutation sites by fluorescence quantitative PCR based on lock-loop probes :202310019274 [P]. Guangdong Province: CN115927573A, 2023-04-07.
- [11] 孙青,宋华峰,黄帆.基于基因芯片技术对耐利福平或异烟肼结核分枝杆菌基因突变位点的检测分析[J].抗感染药学,2023,20(10):1108-1112.  
SUN Q, SONG H F, HUANG F. Detection and analysis of gene mutation sites of *Mycobacterium tuberculosis* by

- CHEN J S, YUAN W J, HE B B, et al. Genetic identification and sequence analysis of three individuals of rare ABO variant Bw subgroup[J]. Chinese Journal of Medical Genetics, 2022, 39(9): 1021-1024.
- [2] HULT A K, YAZER M H, JØRGENSEN R, et al. Weak a phenotypes associated with novel ABO alleles carrying the A2-related 1061C deletion and various missense substitutions[J]. Transfusion, 2010, 50(7): 1471-1486.
- [3] YAMAMOTO F, MARKEN J, TSUJI T, et al. Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA[J]. the Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(2): 1146-1151.
- [4] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[S]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 117-139.
- SHANG H, WANG Y S, SHENG Z Y National guide to clinical laboratory procedures[S]. 4th Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 117-139.
- [5] 李义深, 李好蓉, 张文菊, 等. 3例ABO血型鉴定正反不符患者基因序列分析——附1个新的ABO等位基因突变点位的发现[J]. 中国输血杂志, 2022, 35(10): 1075-1077.
- LI Y S, LI Y R, ZHANG W J, et al. Gene sequencing of three cases with discrepant ABO blood group identification results including discovery of a new ABO allele mutation[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2022, 35(10): 1075-1077.
- [6] 孔永奎, 朱鹏飞, 刘欣, 等. p.Arg352Gln突变对Bw07转移酶影响的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2024, 47(3): 286-292.
- KONG Y K, ZHU P F, LIU X, et al. Studies on the effect of the p.Arg352Gln mutation on Bw07 transferase[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2024, 47(3): 286-292.
- [7] 黄明珠, 孟祥红, 亢晓薇. Bw03/o2亚型一例报告[J]. 北京医学, 2023, 45(4): 356, 359.
- HUANG M Z, MENG X H, KANG X W. A case report of Bw03/o2 subtype[J]. Beijing Medical Journal, 2023, 45(4): 356, 359.
- [8] SHAO L N, YANG Y C, XIA Y X, et al. Novel missense mutation c.797T>C (p.Met266Thr) gives rise to the rare B(A) phenotype in a Chinese family[J]. Vox Sanguinis, 2024, 119(4): 383-387.
- [9] DARBY J F, HOPKINS A P, SHIMIZU S, et al. Water networks can determine the affinity of ligand binding to proteins[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(40): 15818-15826.
- [10] 刘昕, 王莲慧, 徐秀云, 等. ABO基因第6外显子c.278C>T突变导致BW.12亚型的研究[J]. 中国实验血液学杂志, 2022, 30(5): 1557-1561.
- LIU X, WANG L H, XU X Y, et al. Study on BW.12 subtype caused by c.278C>T mutation in exon 6 of ABO gene[J]. Journal of Experimental Hematology, 2022, 30(5): 1557-1561.

收稿日期: 2024-11-09

修回日期: 2024-12-13

## (上接第115页)

- rifampicin or isoniazid based on gene chip technology[J]. Anti-Infection Pharmacy, 2023, 20(10): 1108-1112.
- [12] KANJI A, HASAN R, HASAN Z. Efflux pump as alternate mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Indian Journal of Tuberculosis, 2019, 66(1): 20-25.
- [13] LI H R, YUAN J F, DUAN S J, et al. Resistance and tolerance of *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents—How *M. tuberculosis* can escape antibiotics[J]. WIREs Mechanisms of Disease, 2022, 14(6): e1573.
- [14] The Editors. Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy?[J]. Journal of Medical Microbiology, 2001, 50(12): 1018-1020.
- [15] 蒋燕成, 张建明, 陈紫萱, 等. 结核分枝杆菌耐药基因突变特征及与耐药水平关系的研究[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(15): 2145-2148.
- JIANG Y C, ZHANG J M, CHEN Z X, et al. Study on characteristics of drug resistance gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and its correlation with drug resistance level[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2023, 20(15): 2145-2148.
- [16] 田丽, 周伟, 黄星, 等. 中国异烟肼耐药结核分枝杆菌基因突变特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(4): 354-361.
- TIAN L, ZHOU W, HUANG X, et al. Gene mutation analysis of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2022, 44(4): 354-361.
- [17] 王悦, 孟湃喆, 于艳红. 荧光PCR熔解曲线技术在结核病耐药诊断中的应用价值[J]. 中国当代医药, 2021, 28(20): 194-197.
- WANG Y, MENG P Z, YU Y H. Application value of fluorescence PCR melting curve analysis in detecting tuberculosis drug resistance[J]. China Modern Medicine, 2021, 28(20): 194-197.
- [18] 王丹吉, 刘巧, 卢鹏, 等. 基因芯片技术快速检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究[J]. 现代预防医学, 2018, 45(11): 2047-2051.
- WANG D J, LIU Q, LU P, et al. Clinical study on rapid detection of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* by gene chip technology[J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45(11): 2047-2051.
- [19] 董启珍, 赵承杰, 吴晓茹. 基因芯片技术在新发涂阳肺结核患者结核杆菌菌种鉴定及药敏试验中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(7): 1024-1028.
- DONG Q Z, ZHAO C J, WU X R. Application of gene chip technology in strain identification and drug sensitivity test of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with new smear positive pulmonary tuberculosis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2021, 31(7): 1024-1028.
- [20] SHAO Y, LI Y S, SONG H H, et al. A retrospective cohort study of isoniazid-resistant tuberculosis treatment outcomes and isoniazid resistance-associated mutations in eastern China from 2013 to 2018 [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 22: 847-853.

收稿日期: 2025-03-05

修回日期: 2025-05-06