

• 基础实验研究论著 •

结核分枝杆菌耐利福平基因变异株的体外最小抑菌浓度研究*

刘成永¹, 张瑞梅^{2△}, 成松¹, 侯远沛¹, 张海晴²
(徐州市传染病医院: 1. 检验科; 2. 结核科, 江苏徐州 221004)

摘要:目的 研究结核分枝杆菌(MTB)耐利福平临床分离株基因突变对其体外最小抑菌浓度(MIC)测定结果的影响。方法 用基因芯片对临床分离的对利福平耐药的 175 株 MTB 及对利福平敏感的 48 株 MTB 进行耐药基因检测; 并对所有标本进行利福平的 MIC 测定, 比较不同变异株的 MIC 测定结果。结果 对利福平耐药的 MTB 临床分离株基因突变以 531、526、516、533 位点单突变为主; 531 位点单突变的利福平耐药变异株 MIC 高于 526 位点单突变的耐药变异株, 差异有统计学意义($t'=2.223\ 7, t'\alpha=2.044\ 9, P<0.05$); 526 位点单突变的利福平耐药变异株 MIC 高于 516 位点单突变的耐药变异株, 差异有统计学意义($t=2.205\ 6, P=0.0329, P<0.05$)。双突变者均有较高的 MIC 测定值。结论 合理的基因芯片设计能检出 95.0% 以上的对利福平耐药 MTB 变异株; 对利福平耐药的 MTB 变异株有不同的基因突变模式, 且不同突变模式的 MTB 耐药程度不同, 可以为临床用药提供参考。

关键词:微生物敏感性试验; 利福平; 突变; 分枝杆菌, 结核
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.002 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2014)03-0258-03

In vitro minimal inhibitory concentration determination of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistant gene mutants*
Liu Chengyong¹, Zhang Ruimei^{2△}, Cheng Song¹, Hou Yuanpei¹, Zhang Haiqing²
(1. Clinical Laboratory; 2. Department of Tuberculosis, Xuzhou Infectious Diseases Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

Abstract: **Objective** To study gene mutations of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in clinical isolated samples, and their influence on minimal inhibitory concentration (MIC) determination in vitro. **Methods** Rifampin resistant genes of 175 *Mycobacterium tuberculosis* rifampin-resistant strains and 40 rifampin-sensitive strains in clinical isolated were detected by gene chip technology, and the MICs on rifampin were determined in all these selected samples, and compared with MIC results from different gene mutations. **Results** Gene mutation sites of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from clinical isolated mainly included 531, 526 and 516, 533; The MIC of single 531 site mutation in rifampin-resistant strains was higher than single 526, $t'=2.223\ 7, t'\alpha=2.0449, P<0.05$; The MIC of single 526 site mutation in RFP resistant strains was higher than single 516, $t=2.205\ 6, P=0.032\ 9, P<0.05$. Combined mutation induced higher MICs. **Conclusion** The reasonable gene chip design can detect over 95% rifampin-resistant genes. Mutation patterns of genes have significant influence on the resistance, which provides an important reference to the clinic.

Key words: microbial sensitivity tests; rifampin; mutation; *Mycobacterium tuberculosis*

结核分枝杆菌(MTB)感染引起的结核病是严重威胁人类健康的传染病,而耐药结核病的流行给临床医生带来了巨大挑战^[1],利福平是传统的抗结核一线药物,但也容易使 MTB 对其产生耐药。由于 MTB 编码 RNA 聚合酶的 β 亚基的 *rpoB* 基因的突变多分布在“利福平耐药决定区”^[2],通过分子生物学方法检测该区内的特定突变可发现 95% 以上的对利福平耐药的 MTB 菌株,并且快速、灵敏。但是临床发现不同耐药变异基因型的菌株常表现出对利福平不同程度的耐药。因此,对不同基因突变型的利福平耐药变异株进行体外耐药水平的测试,对于临床制定治疗方案有重要指导意义。本研究利用基因芯片法^[3]对利福平耐药的 MTB 进行基因突变的检测,将其分为不同的基因突变类型,并分析不同突变类型 MTB 菌株的最小抑菌浓度(MIC)的差异,以为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 175 株对利福平耐药的 MTB 及 48 株对利福

平敏感的 MTB 均来自于本院临床分离后保存的菌株,且菌种鉴定皆为为人型 MTB;质控 MTB 菌株为 H37Rv(ATCC27294)由中国食品药品检定研究院提供。

1.2 仪器与试剂 罗氏培养管购于珠海贝索生物技术有限公司,使用罗氏培养基的利福平药物临界浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$;利福平 MIC 快速测定试剂盒购自深圳市怡百世生物技术有限公司。结核分枝杆菌耐药突变基因检测试剂盒由深圳亚能生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 耐药性的检测 改良罗氏比例法测定 MTB 的耐药性:按中国防痨协会制定的《结核病诊断细菌学检验规程》^[4]进行微生物敏感性试验,同时接种含药和不含药的对照培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 周观察并报告结果。耐药标准:采用 WHO 推荐的的比例法,含药培养基菌落数/对照不含药培养基菌落数大于或等于 1% 为耐药, <1% 为敏感。利福平 MIC 的测定:检测

* 基金项目:徐州市科技计划项目资助(XF11C089)。 作者简介:刘成永,男,主任医师,主要从事临床实验室管理、分子生物学方面的工作和研究。 △ 通讯作者, E-mail: crblt@126.com。

前,将待检菌株转种至罗氏培养基,37℃培养 1~2 周。检测时,严格按照操作说明书进行并观察结果。

1.3.2 基因芯片检测 试剂盒中的 PCR 扩增引物有 4 对,可对包括 *rpoB* 在内的五种不同耐药基因进行扩增。引物序列如下,*rpoB* 区:5'-CAG GAC GTG GAG GCG ATC-3',5'-GCT CAC GTG ACA GAC CG-3';*katG* 区:5'-GCA GAT GGG CTT GGG CT-3',5'-CAG CAG GGC TCT TGG TCA-3';*inhA* 启动子区:5'-CCT CGC TGC CCA GAA AGG-3',5'-ATC CCC CGG TTT CCT CG-3';*ahpC* 启动子区:5'-TTG CCT GGG TGT TCG TCA CTG GT-3',5'-TTG CCT GGG TGT TCG TCA CTG GT-3'。PCR 扩增条件为:37℃ 10 min,94℃ 变性 4 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,循环 30 次;最后 72℃ 10 min。扩增产物的杂交、芯片显色和结果等分析操作步骤按结核分枝杆菌耐药突变基因检测试剂盒说明书进行。

表 1 耐药株和敏感株突变类型的分布及 MIC 测定

突变类型	耐药株(<i>n</i> =175)		敏感株(<i>n</i> =48)	
	突变株(<i>n</i>)	MIC($\bar{x}\pm s,\mu\text{g/mL}$)	突变株(<i>n</i>)	MIC($\bar{x}\pm s,\mu\text{g/mL}$)
单 531	87	68.2±9.0	0	—
单 516	16	52.5±10.6	2	30.0±0.0
单 533	13	45.4±5.2	7	15.7±7.9
单 513	4	80.0±0.0	0	—
单 526	28	61.7±14.6	4	12.5±5.0
单 512	2	40.0±0.0	0	—
531、526 双突变	7	78.6±3.8	0	—
531、516 双突变	5	76.0±5.5	0	—
526、516 双突变	4	67.5±5.0	0	—
526、513 双突变	1	60.0±0.0	0	—
检出总计	167	—	13	—
未检出	8	50.0±10.7	35	—

—:该项无数据。

2.2 基因突变类型对 MIC 测定的影响 531 位点单突变的利福平耐药株的 MIC 高于 526 位点单突变的利福平耐药株($t'=2.223\ 7,t'\alpha=2.044\ 9,P<0.05$);526 位点单突变的利福平耐药株的 MIC 高于 516 位点单突变的利福平耐药变异株($t=2.205\ 6,P=0.032\ 9$)。双突变耐药菌株均有较高的 MIC 测定值。利福平敏感株中 516、533、526 位点单突变者的 MIC 测定值均低于 40.0 μg/mL,其比例法药敏试验表现为对利福平敏感。

3 讨 论

利福平是一线抗结核药物之一,由于其对结核病的良好疗效使其成为结核病短程化治疗的基石。利福平通过与细菌 RNA 聚合酶 β 亚基结合,抑制转录,从而使细菌死亡。MTB 对利福平的耐药性已被证实与 RNA 聚合酶 β 亚基的编码基因 *rpoB* 的 81 个碱基的核心区域的突变有关^[5]。

基因芯片法具有快速、特异的优点^[6-7]。采用基因芯片方法检测点突变对于耐药的检测具有很高的特异度^[8]。本研究采用了可用于检测 *rpoB* 基因 513、516、526、522、533、531 位点突变的芯片,结果显示:MTB 耐利福平临床分离株 *rpoB* 基因

1.4 统计学处理 采用 PEMS3.0 医学统计软件进行统计分析,MIC 的检测值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不同突变类型菌株间的比较采用 *t* 检验,方差不齐时用 *t'* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同突变类型的分布及 MIC 的测定结果 对利福平耐药的 MTB 临床分离株 *rpoB* 基因突变以 531、526、516、533 位点单突变为主,也有部分为双突变,检出突变的菌株数占耐药株总数的 95.4%(167/175)。检出双突变的有 4 种类型,共 17 株,占耐药株总数的 9.7%(17/175);由于基因芯片法设计位点有限,此方法不能检出突变基因的菌株占耐药株总数的 4.6%(8/175);敏感株中仍检出耐药基因的占 27.1%(13/48),突变类型为 515、533 和 526 位点单突变。见表 1。

突变以 531、526、516、533 位点单突变为主^[9],检出率占耐药株总数的 95.4%;双突变检出 4 种类型,共 17 株,占耐药株总数的 9.7%。由于基因芯片设计的位点有限,此方法不能检出 *rpoB* 突变基因的占耐药株总数的 4.6%;敏感株中仍检出耐药基因的占 27.1%,均为 515、533 和 526 位点单突变。本研究用 MIC 法测定每种单/双突变临床分离株的 MIC,这对于分析利福平耐药基因 *rpoB* 的突变对体外药敏试验结果的影响有一定的意义,可进一步评价基因突变对利福平耐药性的影响。结果显示,531 位点单突变的利福平耐药株 MIC 高于 526 位点单突变的耐药株,526 位点单突变的利福平耐药株 MIC 高于 516 位点单突变的耐药株;双突变者的 MIC 测定值较高。利福平敏感株中 516、533、526 位点单突变者均有低于 40.0 μg/mL 的 MIC 检测结果,而且在比例法药敏试验表现为对利福平敏感。这可能是因为菌株这一细菌群体中耐药细菌数目尚未达到一定比例,而 PCR 扩增的高灵敏对会导致出现阳性结果。基因芯片法对耐药基因突变检测阴性并不意味着该菌株着对药物敏感,也可能存在其他不在芯片设计位点中可以导致耐药的突变位点^[10]。

综上所述,不同的 *rpoB* 基因型对利福平的耐药程度不同^[11],531 和 526 位点突变可能与体外高浓度耐药有关,533 位点突变可能与体外低浓度耐药有关^[12]。一些检出耐药突变基因的菌株不一定对利福平耐药。*rpoB* 耐药基因有不同的突变模式,可以通过分析菌株的耐药突变基因型来判定对利福平的药物敏感性^[13],各突变模式的耐药程度不同,MIC 的测定结果与比例法有良好的一致性^[14],可以为临床用药提供参考。

参考文献

[1] 沙巍,王洁,胡忠义,等. 痰噬菌体生物扩增法检测一线抗结核药物敏感性的临床研究[J]. 中华临床感染病杂志,2011,4(5):271-274.

[2] 李桂莲,王振秀,赵德福. 结核分枝杆菌耐药基因的研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制,2006,14(5):377-379.

[3] 谢士达,刘成永,张凤池,等. 基因芯片技术快速检测结核分枝杆菌异烟肼、利福平耐药性[J]. 临床肺科杂志,2008,13(2):147-149.

[4] 吴龙章,钟炳棠,刘燕文,等. 对《结核病诊断细菌学检验规程》的一点看法[J]. 中国防痨杂志,2012,34(3):192-193.

[5] Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria[J]. Antimicrob Agents Chemother,1994,38(10):2380-2386.

[6] 崔振玲,胡忠义,王洁,等. 结核分枝杆菌临床分离株异烟肼耐药性四种测定方法的比较[J]. 中华结核和呼吸杂志,2005,28(4):

245-249.

[7] 刘晶波,乐军,韩敏,等. 应用微阵列技术快速鉴定常见致病性分枝杆菌[J]. 中华临床感染病杂志,2010,3(1):44-47.

[8] 陈红兵,吴丽霞,张娟,等. 结核分枝杆菌耐药多药性基因芯片联合检测[J]. 中国公共卫生,2010,26(9):1119-1121.

[9] 刘敬华,张丽水,刘志广,等. 结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 突变特征初步分析[J]. 中华流行病学杂志,2006,27(11):973-976.

[10] 赵玉玲,杨洪毅,马晓光,等. 河南省耐多药结核分枝杆菌利福平耐药基因 *rpoB* 的突变特征[J]. 郑州大学学报:医学版,2012,47(2):166-169.

[11] 胡族琼,蔡杏珊,罗春明,等. 利福霉素耐药结核分枝杆菌 *rpoB* 突变与利福布汀耐药水平的关系[J]. 中国感染控制杂志,2011,10(6):401-404.

[12] 李国利,张灵霞,王倩,等. 结核分枝杆菌临床分离株利福平耐药表型及 *rpoB* 基因型分析[J]. 临床和实验医学杂志,2011,10(21):1649-1652.

[13] 张吉平,张小刚,何秀云,等. 结核分枝杆菌利福平耐药基因突变的研究[J]. 中国预防医学杂志,2006,7(5):409-411.

[14] Yajko DM, Madej JJ, Lancaster MV, et al. Colorimetric method for determining MICs of antimicrobial agents for Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol,1995,33(9):2324-2327.

(收稿日期:2013-11-02)

(上接第 257 页)

以上女性进行 HPV16、18 基因分型检测,见图 1。

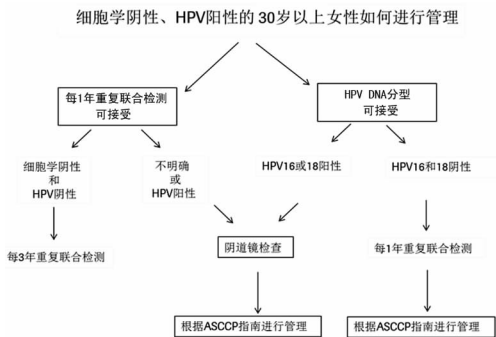


图 1 细胞学阴性、HPV 阳性的 30 岁以上女性的宫颈癌筛查流程

由于不同 HPV 亚型的致病性及预后的差异,对 HPV16、18 进行分型,将有助于更好地对高风险人群进行风险分层管理,及时发现细胞学检查正常者中患 CIN 的高危人群,以及细胞学检查为 ASC-US 者中需要更密切随访的人群。而对于其他 12 种高风险 HPV,近期发生 CINⅡ 以上病变的风险相对较低,无需进行基因分型。ASCCP 指南中明确指出:不对 HPV16、18 以外的 HPV 进行基因分型。

此外,宫颈鳞癌患者 HPV16 的感染率为 62%,HPV18 感染率为 8%。宫颈腺癌患者 HPV16 的感染率为 50%,HPV18 感染率为 32%。可见,相比 HPV18 和其他高风险 HPV 亚型,宫颈鳞癌和腺癌患者 HPV16 的感染者都更高^[6]。而就 HPV18 而言,宫颈腺癌患者的感染较为普遍,且感染率有逐渐增长趋势。

新一代的 cobas 4800 HPV DNA 检测系统由全自动样品

制备仪以及全自动 PCR 扩增仪组成,具有经临床验证的判定标准,可以完成 14 种高风险 HPV 病毒株筛查,并同时 HPV16、18 进行基因分型的全自动检测方法;其灵敏度高,检测通量高、重复性好,是目前进行 HPV 基因检测的较好方法,在大样本筛查中具有独特优势,有助于宫颈癌的风险分层,帮助临床更好地对宫颈癌患者进行分层管理。

参考文献

[1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papilloma virus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. J Pathol,1999,189(1):12-19.

[2] Castle PE, Stoler MH, Wright TC Jr, et al. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study[J]. Lancet Oncol,2011,12(9):880-890.

[3] ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology. ACOG Practice Bulletin no. 109: Cervical cytology screening [J]. Obstet Gynecol,2009,114(6):1409-1420.

[4] World Health Organization. Human papillomavirus: HPV[EB/OL]. (2010-09-03). <http://www.who.int/immunization/topics/hpv/en>.

[5] Chen W, Zhang X, Molijn A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18[J]. Cancer Causes Control,2009,20(9):1705-1713.

[6] de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study[J]. Lancet Oncol,2010,11(11):1048-1056.

(收稿日期:2013-12-08)