

论著·临床研究

合肥地区耐多药结核分枝杆菌异烟肼、链霉素及乙胺丁醇耐药相关基因位点表达研究*

戚应杰, 刘婷, 查晓丹, 石玉如, 王云, 岳莉, 马筱玲

(中国科学技术大学附属第一医院/安徽省立医院感染病院区检验科, 安徽合肥 230000)

摘要:目的 研究耐多药结核分枝杆菌异烟肼(INH)、链霉素(SM)及乙胺丁醇(EMB)耐药相关基因位点的表达情况。方法 选取该院 2013 年 1 月至 2017 年 12 月临床分离的 101 株耐多药结核分枝杆菌, 利用测序法和基因芯片法分别检测 INH、SM 和 EMB 耐药相关基因及突变位点。结果 101 株耐多药结核分枝杆菌中对 SM 耐药率 69.3%; 对 EMB 耐药率 51.4%; 对 SM 和 EMB 二者均耐药的耐药率 44.5%。基因芯片法检出 95 例 INH 耐药相关基因突变, 其中 katG 基因 315M 位点突变率为 77.8%; inhA 基因 -15M 位点突变率为 89.4%。检出 64 例 rpsL SM 耐药相关基因, 其中 43M 位点突变率为 89.0%; 88M 位点突变率为 11.0%。检出 47 例 embB EMB 耐药相关基因, 以 306M2 位点突变为主, 突变率为 68.0%。测序法检出 98 例 INH 耐药相关基因突变, katG 基因突变以 315 位点为主突变率为 73.4%; inhA 基因突变以 -15 位点为主突变率为 87.7%; oxyR-ahpC 基因 -12 和 -10 位点突变率分别为 10.2% 和 8.2%。检出 68 例 SM 耐药相关基因突变, rpsL 基因以 43 位点为主突变率为 86.8%; rrs 基因 512、513、516 位点突变率分别为 5.9%、8.8%、8.8%。检出 50 例 EMB 耐药相关基因 embB 以 306 位点为主突变率为 88.0%。结论 耐多药结核分枝杆菌 INH、SM 及 EMB 耐药基因位点表达可作为结核分枝杆菌临床检测耐药性的有效依据, 为提高耐多药结核分枝杆菌耐药性检测的敏感度, 应将 INH 耐药相关 oxyR-ahpC 基因和 SM 耐药相关 rrs 基因纳入我国快速分子诊断产品中。

关键词:耐多药; 结核分枝杆菌; 基因位点**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.14.012**中图法分类号:**R378.911**文章编号:**1673-4130(2019)14-1713-04**文献标识码:**A

Expression studies of drug-resistance related genes loci of isoniazid, streptomycin and ethambutol in multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Hefei area*

QI Yingjie, LIU Ting, CHA Xiaodan, Shi Yuru, WANG Yun, YUE Li, MA Xiaoling
(Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China/Anhui Provincial Hospital, Infectious Disease Hospital District, Hefei, Anhui 230000, China)

Abstract: Objective To study the expression situation of drug-resistance related genes of isoniazid, streptomycin and ethambutol in multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis. **Methods** 101 strains of clinical isolated multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis selected in a hospital from January 2013 to December 2017 were separately analyzed by sequencing method and gene chip to detect the isoniazid, streptomycin and ethambutol resistance related genes and mutations loci. **Results** The resistance rate against streptomycin in 101 isolated multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis stains was 69.3%; Resistance rate against ethambutol was 51.4%, resistance rate against streptomycin and ethambutol was 44.5%; 95 cases of gene mutations related to isoniazid were detected by gene chip method, among which the mutation rate of katG gene at 315M was 77.8%, the mutation rate of inhA gene at -15M was 89.4%; The mutation rate at 43M loci was 89.0% in 64 cases of streptomycin resistance related gene rpsL. The mutation rate at 88M site was 11.0%; 47 cases of embB were detected to be drug resistance gene related to ethambutol, mainly with 306M2 site mutation rate of 68.0%. 98 cases of gene mutation of isoniazid resistance were detected by sequencing method, and the mutation rate of katG was 73.4%, mainly at 315 loci; The mutation rate of inhA gene was 87.7% at -15 loci; the

* 基金项目: 合肥市卫计委应用医学研究项目(hkw2016zd012)。

作者简介: 戚应杰, 男, 主任技师, 主要从事感染性疾病的实验室诊断及研究。

本文引用格式: 戚应杰, 刘婷, 查晓丹, 等. 合肥地区耐多药结核分枝杆菌异烟肼、链霉素及乙胺丁醇耐药相关基因位点表达研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(14): 1713-1716.

mutation rate of oxyR-ahpC gene were 10.2% and 8.2% at oxyR-ahpC -12 and -10 site. 68 cases of streptomycin resistance gene mutation were detected, and the mutation rate of rpsL gene mainly at 43 loci was 86.8%, the mutation rates of RRS gene mainly at 512,513,516 site were 5.9%, 8.8% and 8.8%. The major mutation rate of embB at 306 loci related to ethambutol resistance in 50 cases was 88.0%. **Conclusion** The expression of resistance gene loci of isoniazid, streptomycin and ethambutol can be regarded as an effective basis of clinical detection of drug resistance in multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis. Isoniazid related resistant oxyR-ahpC gene and streptomycin related resistant RRS gene should be included in China's rapid molecular diagnosis products in order to improve the sensitivity of multi-drug resistant Mycobacterium tuberculosis drug resistance detection.

Key words: multi-drug resistance; Mycobacterium tuberculosis; gene loci

近年来,全球结核病的防控面临严峻的考验,尤其是耐多药结核病(MDR-TB)的流行,MDR-TB 定义为至少对利福平(RFP)和异烟肼(INH)耐药。据 2018 年世界卫生组织(WHO)全球结核病报告估计^[1],目前全球 MDR-TB 患者约有 30 万人,且 MDR-TB 的治愈率仅有 55%,2017 年约有 18 万人死于 MDR-TB。MDR-TB 的防控迫在眉睫。INH、链霉素(SM)、乙胺丁醇(EMB)是现阶段治疗结核病最为常用的一线药物^[2]。本文采用基因芯片法与测序法对 101 株耐多药结核分枝杆菌三种常用一线药物 INH、SM、EMB 的耐药基因位点表达情况进行更进一步探究,为应用适合合肥地区甚至更大范围快速检测 MDR-TB INH、SM、EMB 的耐药性提供更多的分子诊断数据。现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 菌株来源 101 株耐多药结核分枝杆菌均取自 2013 年 1 月至 2017 年 12 月在本院接受诊治的结核病患者。结核分枝杆菌标准野生对照株为 H37Rv (ATCC27294)由中国疾病预防控制中心传染病控制所提供。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI 公司 ABI7300 基因扩增仪;深圳亚能公司 YN-H16 分子杂交仪;操作按仪器说明书进行。结核耐药突变检测试剂盒购自深圳亚能生物技术有限公司;INH、RFP、EMB、SM 药敏培养基和菌种鉴别培养基购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株分离鉴定和体外药物敏感试验 分离到的阳性分枝杆菌菌株,采用 WHO 推荐的改良罗氏培养基比例法,培养 2~3 周,用含对硝基苯甲酸(PNBA)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)的鉴别培养基进行菌种鉴定。各含药培养基内的药物临界浓度分别为 INH 0.2 mg/L, RFP 40 mg/L, SM 4 mg/L, EMB 2 mg/L。菌株在做药物敏感性试验的同时采用 PNB/TCH 进行菌群的初步鉴定,鉴别结核、非结核和牛分枝杆菌,见表 1。

1.3.2 细菌基因组 DNA 提取 从改良 L-J 培养基

斜面生长良好的耐多药结核分枝杆菌刮取一菌环,溶于 200 μL 缓冲液(pH=8.0)中,经 85 °C 水浴 30 min 灭活,取菌悬液 20 μL 加入 20 μL M 裂解液混匀,然后 95 °C 沸水煮沸 10 min,相对离心力(RCF)=6 285×g 离心 2 min,取上清液转移至新管中即为 DNA 模版,-20 °C 保存。

表 1 结核、非结核和牛分枝杆菌鉴定

菌种	PNB	TCH	L-J
结核分枝杆菌	-	+	+
牛分枝杆菌	-	-	+
非结核性分枝杆菌	+	+	+

1.3.3 耐多药结核分枝杆菌基因聚合酶链反应(PCR)扩增 取 4 μL DNA 模版加入扩增管内,RCF=3 142 g 离心 2 s 后放入 PCR 仪按程序扩增,扩增条件为:95 °C 10 min,95 °C 45 s,54 °C 30 s,68 °C 60 s×40 次,68 °C 延伸 5 min。从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 的 Genbank 中获得结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的 katG、inhA、embB、rpsL、rrs 基因序列^[3]。采用 primer premier 5.0 设计引物,引物序列见表 2。

表 2 基因合成引物序列

引物名称	引物序列	PCR 产物长度(bp)
KatG	正向:5'-CGA CGA TGC TGG CCA CTG AC-3'	435
	反向:5'-CGA CGA TGC TGG CCA CTG AC-3'	
inhA	正向:5'-CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA-3'	248
	反向:5'-ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT-3'	
rpsL	正向:5'-GTG TGC AGG TGG TGC ATG GC-3'	701
	反向:5'-ATC CAG TTC TCA AAC ACC AC-3'	
rrs	正向:5'-GCA TGG CCG ACA AAC AGA AC-3'	440
	反向:5'-GCC CCT TGC GTG GCA TCA GC-3'	
embB	正向:5'-CGG CAT GCG CCG GCT GAT TC-3'	387
	反向:5'-CCA CAG ACT GGC GTC GCT G-3'	

1.3.4 基因芯片杂交、洗膜显色与结果判断 将

PCR产物 25 μ L 加入离心管中沸水煮 10 min, 放入已经预热的杂交箱中于 58.3 $^{\circ}$ C 杂交 2 h, 取出膜条洗涤 15 min, 最后将膜条浸泡在显色液中避光显色观察结果, 蓝色为检出该位点。该基因芯片法可检测异烟肼耐药相关突变位点: 315M、-15M; 链霉素耐药相关突变位点: 43M、88M; 乙胺丁醇耐药相关突变位点: 306M1、306M2、306M3。

1.3.5 DNA 序列分析 101 株耐多药菌株和部分正常样本送往深圳亚能生物公司进行序列分析, 以便于检测 DNA 扩增的特异性和基因芯片杂交结果的准确性, 同时便于挖掘新的耐药基因突变位点。测序结果比用 GENE 软件中的 Align 将测序结果与标准菌株 H37Rv 的基因序列进行比对^[4], 确定基因突变位点。

1.4 统计学处理 采用数理统计软件 SPSS19.0 对收集的数据进行整理与统计分析, 率及构成比等计数资料的比较行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 101 株 MDR-TB 的 SM、EMB 耐药率 101 例 MDR-TB 中对 SM 耐药的 70 例, 耐药率 69.3%; 对 EMB 耐药的 52 例, 耐药率 51.4%; 对 SM 和 EMB 二者均耐药的 45 例, 耐药率 44.5%。

2.2 基因芯片法检测 INH、SM 及 EMB 基因突变位点分布情况 101 例 MDR-TB 中基因芯片法检出 95 例 INH 耐药相关基因, 其中 74 例 katG 基因 315M 位点突变, 突变率为 77.8%; 85 例 inhA 基因 -15M 位点突变, 突变率为 89.4%; 72 例 315M 与 -15M 位点共同突变, 突变率为 75.7%。检出 64 例 rpsL SM 耐药相关基因, 其中 57 例 43M 位点突变, 突变率为 89.0%; 7 例 88M 位点突变, 突变率为 11.0%。检出 47 例 embB EMB 耐药相关基因, 其中 16 例 306M1 位点突变, 突变率为 34.0%; 32 例 306M2 位点突变, 突变率为 68.0%; 2 例 306M3 位点突变, 突变率为 4.2%。

2.3 测序法检测 INH、SM 及 EMB 基因突变位点分布情况 101 例 MDR-TB 中测序法检出 98 例 INH 耐药相关基因突变, 其中 72 例 katG 基因 315 位点突变, 突变率为 73.4%, 2 例 katG 基因 463 位点突变, 突变率为 2.0%; 86 例 inhA 基因 -15 位点突变, 突变率为 87.7%, 1 例 inhA 基因 -8 位点突变, 突变率为 1.1%, 1 例 inhA 基因 -17 位点突变, 突变率为 1.1%; 10 例 oxyR-ahpC 基因 -12 位点突变, 突变率为 10.2%, 8 例 oxyR-ahpC 基因 -10 位点突变, 突变率为 8.2%。检出 68 例 SM 耐药相关基因突变, 其中 59 例 rpsL 基因 43 位点突变, 突变率为 86.8%; 9 例 rpsL 基因 88 位点突变, 突变率为 13.2%; 4 例 rrs 基因 512 位点突变, 突变率为 5.9%, 6 例 rrs 基因 513 位点突变, 突变率为 8.8%, 6 例 rrs 基因 516 位点突

变, 突变率为 8.8%。检出 50 例 embB EMB 耐药相关基因, 其中 44 例 306 位点突变, 突变率为 88.0%; 2 例 406 位点突变, 突变率为 4.0%。

3 讨论

随着抗菌药物大量应用使得结核病也出现了新的分型, MDR-TB 便是其中之一。MDR-TB 的出现不仅增加了结核病治疗的难度, 而且为患者的生命安全带来了极大的威胁, MDR-TB 控制的关键是早期选择敏感药物联合治疗^[5]。INH、SM 和 EMB 是抗结核治疗的主要一线药物, 如何早期快速检测其在 MDR-TB 中的耐药性对 MDR-TB 的及时有效治疗至关重要。目前的研究表明, 结核分枝杆菌耐药的主要机制是因为基因突变, 结核分枝杆菌 katG、inhA、embB、rpsL 基因的点突变分别与结核分枝杆菌耐受 INH、EMB 和 SM 的药物密切相关^[6]。本研究采用比例药敏法选取 101 株 MDR-TB, 发现 SM 耐药率为 69.3%, EMB 耐药率为 51.4%, 远高于我国非 MDR-TB 的耐药率^[7], 这可能是这两种药物在临床使用频率过高有关。为进一步探究合肥地区 MDR-TB 的耐药基因位点表达情况, 同时挖掘有无新的基因型及突变位点, 本研究采用 PCR+反向点杂交(RDB)相结合的基因芯片技术和测序法检测 101 株 MDR-TB 的 INH、SM、EMB 的耐药基因位点表达情况。结果发现 101 例 MDR-TB 中基因芯片法和测序法分别检出 95 例和 98 例 INH 耐药相关基因突变, 另外几例没有检出耐药相关基因位点突变, 可能存在本研究之外的基因型及位点或其他耐药机制, 与 INH 耐药的相关基因很多, 最常见的有 katG、inhA、ndh、oxyR-ahpC、kasA 等^[8]。本研究中 katG 基因 315 位点和 inhA 基因 -15 位点均具有较高的突变率, 提示 INH 耐药相关基因以 katG 基因 315 位点和 inhA 基因 -15 位点为主, 与国内文献报道一致^[9-10]。测序法检测结果提示还存在其他基因型及位点表达, 本研究还检测出 2 例 katG 基因 463 位点突变, 1 例 inhA 基因 -8 位点突变, 1 例 inhA 基因 -17 位点突变, 特别是检测出 10 例 oxyR-ahpC 基因 -12 位点突变, 突变率为 10.2%, 8 例 oxyR-ahpC 基因 -10 位点突变, 突变率为 8.2%。提示实验室运用分子生物学手段进行 INH 耐药基因位点检测时应重视 oxyR-ahpC 基因及其位点突变的检测。SM 是氨基环醇糖苷类抗菌药物, 研究表明, 编码小亚基核糖体蛋白 s12 的 rpsL 和编码 16sRNA 的 rrs 基因突变是 MTB 耐 SM 的主要分子机制^[11]。本研究检出 SM 耐药相关基因 rpsL, 其常见突变位点为 43 和 88, 其中以 43 位点突变为主, 突变率分别为 89.0%(基因芯片法)和 86.8%(测序法); 测序法同时又检出 4 例 rrs 基因 512 位点突变, 突变率为 5.9%, 6 例 rrs 基因 513 位点突变, 突变率为 8.8%, 6 例 rrs 基因 516 位点突变, 突变率为 8.8%, 说明 rrs 也是 SM

耐药的一个常见耐药相关基因,这与其他研究报道观点一致^[11]。本研究中共有 5% SM 耐药株没有检出 rpsL 和 rrs 基因位点突变,是否存在其他耐药机制或耐药相关基因有待进一步研究。EMB 是治疗 MDR-TB 的重要药物,本文中 EMB 的耐药率高达 51.4%,与国内有些研究报道一致^[12-14]。EMB 的耐药机制研究显示,结核分枝杆菌 EMB 耐药性的产生主要与 embCAB 基因座突变有关,且以 embB 突变为主^[15],有研究报道在 EMB 耐药菌株中 embB306 位点突变率约为 68%^[16]。本研究检出 embB306 位点的突变率为 88%,明显高于其他研究报道的突变率,可能系研究的对象为耐多药分枝杆菌有关^[16];测序法同时检出 2 例 embB406 位点突变,提示 embB406 位点也可能是耐药相关基因位点之一。

4 结 论

测序技术有助于从全基因组水平探讨 INH、SM 及 EMB 的耐药机制,耐多药结核分枝杆菌 INH、SM 及 EMB 耐药基因位点表达可作为临床检测耐药性的有效依据;应当将 INH 耐药相关 oxyR-ahpC 基因和 SM 耐药相关 rrs 基因纳入我国快速分子诊断产品中,以提高耐多药结核分枝杆菌耐药性检测的敏感度。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018[R]. Geneva: WHO, 2018.
- [2] MEKONNEN D, ADMASSU A, MULU W, et al. Multi-drug resistant and hetero resistant Mycobacterium tuberculosis and associated gene mutations in Ethiopia[J]. Int J Infect Dis, 2015, 39(1): 34-38.
- [3] 杨亚滨, 博晓真, 高飞. 抗结核药物耐药分子机制的研究进展[J]. 内蒙古医学杂志, 2015, 47(2): 195-198.
- [4] CAFÉ O L, MUNIZ-SOBRINHO J D, VIANA-MAGNO L A, et al. Detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Brazil using a multimer genetic assay for kat G and rpo B genes[J]. Braz J Infect Dis, 2016, 20(2): 166-172.
- [5] 邓海清, 陈保文, 杨蕾, 等. 结核药药效评价用结核分枝杆菌参考菌株的筛选[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(2): 160-166.
- [6] LINGER Y, KUKHTIN A, GOLOVA J, et al. Simplified microarray system for simultaneously detecting rifampin,

isoniazid, ethambutol, and streptomycin resistance markers in Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(6): 2100-2107.

- [7] HE G X, ZHAO Y L, JIANG G L, et al. Prevalence of tuberculosis drug resistance in 10 provinces of China[J]. BMC Infect Dis, 2008, 8(1): 166-168.
- [8] SHI R, ITAGAKI N, SUGAWARA I. Overview of anti-tuberculosis (TB) drugs and their resistance mechanism [J]. Mini Rev Med Chem, 2007, 7(11): 1177-1185.
- [9] 杨修军, 张炜煜, 张立夫, 等. 吉林省耐多药结核分枝杆菌异烟肼耐药基因 KatG 突变特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(8): 902-904.
- [10] 梁亚萍, 赵丽丽, 高漫. 124 例耐多药结核分枝杆菌基因突变特征分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(4): 592-594.
- [11] SUN Y J, LUO J T, WONG S Y, et al. Analysis of rpsL and rrs mutations in Beijing and non-Beijing streptomycin-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates from Singapore[J]. Clin Microbiol Infect, 2010, 16(3): 287-289.
- [12] ZHANG Z J, WANG Y F, PANG Y, et al. Ethambutol resistance as determined by broth dilution method correlates better than sequencing results with embB mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 638-641.
- [13] CHEN Q Y, PANG Y, LIANG Q F, et al. Molecular characteristics of MDR Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Fujian[J]. Tuberculosis, 2014, 94(2): 159-161.
- [14] SHI D W, LI L, ZHAO Y L, et al. Characteristics of embB mutations in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Henan[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(10): 2240-2247.
- [15] SRIVASTAVA S, AYYAGARI A, DHOLE T N, et al. emb nucleotide polymorphisms and the role of embB306 mutations in mycobacterium tuberculosis resistance to ethambutol[J]. Int J Med Microbiol, 2009, 299(4): 269-280.
- [16] RAMASWAMY S V, AMIN A G, GÖKSEL S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2): 326-336.

(收稿日期: 2018-12-20 修回日期: 2019-03-21)

(上接第 1712 页)

- [17] 李方江, 王晓元, 张文婷, 等. 急性冠脉综合征患者血清炎症标记物 IL-6R 及 ADAMTS-1 的研究[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(9): 1479-1480.
- [18] 张云平, 王丽艳, 赵宇, 等. 冠心病患者同型半胱氨酸水平与血小板聚集功能的相关性探讨[J]. 中国血液流变学杂志, 2013, 23(3): 535-537.

- [19] JIN L, YU H, DONG T, et al. The prognostic value of ADP-induced platelet aggregation for bleeding complications in low intermediate risk patients with acute coronary syndrome taking clopidogrel after percutaneous coronary intervention[J]. Heart Lung Circ, 2017, 26(1): 49-57.

(2019-01-02 修回日期: 2019-03-10)