

论著 · 临床研究

广东地区结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药的 pncA、rpsA、panD 基因分型特征研究*

关 平

(广州市胸科医院检验科, 广东广州 510095)

摘要:目的 探讨广东地区结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药与相关基因 pncA、rpsA 和 panD 的突变特征。

方法 收集 2015 年 12 月至 2018 年 2 月在该院就诊的 327 例结核病患者的痰液标本。采用结核分枝杆菌核酸检测法检测痰液中结核杆菌阳性率, 采用 MGIT960 仪器检测吡嗪酰胺的敏感性, 采用 PCR DNA 测序技术对 pncA、rpsA 和 panD 的基因序列进行分析。结果 经结核分枝杆菌核酸检测, 327 份结核患者痰液标本中有 317 份痰液标本为阳性, 阳性率为 96.94%。根据吡嗪酰胺耐药结果, 327 株分离株中吡嗪酰胺耐药 102 株, 吡嗪酰胺敏感 225 株, 耐药率为 31.19%。225 株吡嗪酰胺敏感株中未发现 pncA 突变, 102 株吡嗪酰胺耐药株中有 67 株发现 pncA 基因突变, 突变率为 65.69%。102 株吡嗪酰胺耐药株中检测出 5 株 rpsA 突变, 突变率为 4.90%; 225 株吡嗪酰胺敏感株中检测出 1 株 rpsA 突变, 突变率为 0.44%。吡嗪酰胺耐药菌株的 rpsA 突变率显著高于吡嗪酰胺敏感菌株 ($\chi^2 = 7.476, P = 0.006$)。105 株吡嗪酰胺耐药株中检测到 1 株 panD 突变, 为 G419→A 突变, 突变率为 0.95%。吡嗪酰胺敏感株中未检测到 panD 突变。结论 在中国广东地区, 结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药率较高, 其中 pncA 基因突变较多, 突变位点较为分散; 而吡嗪酰胺耐药结核分枝杆菌中 rpsA 和 panD 基因突变均值得进一步关注。

关键词:结核分枝杆菌; 吡嗪酰胺; 耐药; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.17.004

中图法分类号:R446.6,R378.91+1

文章编号:1673-4130(2019)17-2066-04

文献标识码:A

Characterization of pncA, rpsA and panD mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Guangdong region*

GUAN Ping

(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Thoracic Hospital,
Guangzhou, Guangdong 510095, China)

Abstract: Objective To investigate the mutation characteristics of pyrazinamide resistance and related genes pncA, rpsA and panD in *Mycobacterium tuberculosis* in Guangdong region. **Methods** Sputum specimens of 327 tuberculosis patients were collected from December 2015 to February 2018. *Mycobacterium tuberculosis* nucleic acid test was used to detect the positive rate of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. MGIT960 was used to detect the sensitivity of pyrazinamide. The gene sequences of pncA, rpsA and panD were analyzed by PCR DNA sequencing. **Results** According to tuberculosis nucleic acid detection results, 317 of 327 samples were positive, and the positive rate was 96.94%. According to the results of resistance to pyrazinamide, 102 of 327 isolates were resistant to pyrazinamide, 225 were sensitive to pyrazinamide, and the resistance rate was 31.19%. No pncA mutation was found in 225 Pyrazinamide-sensitive strains, and PncA gene mutation was found in 67 of 102 pyrazinamide-resistant strains, with a mutation rate of 65.69%. Five rpsA mutations were detected in 102 pyrazinamide-resistant strains with a mutation rate of 4.90%, and one rpsA mutation was detected in 225 Pyrazinamide-sensitive strains with a mutation rate of 0.44%. The mutation rate of rpsA in pyrazinamide-resistant strains was significantly higher than that in Pyrazinamide-sensitive strains ($\chi^2 = 7.476, P = 0.006$). The mutation (G419→A) in panD gene was detected in one of 105 pyrazinamide-resistant isolates

* 基金项目: 广东省卫生和计划生育委员会基金项目(201610319430768)。

作者简介: 关平, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验医学研究。

本文引用格式: 关平. 广东地区结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药的 pncA、rpsA、panD 基因分型特征研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(17):2066-2069.

and the mutation ratio was 0.95%. No panD mutation was detected in pyrazinamide-sensitive isolates. **Conclusion** In Guangdong province of China, the drug resistance rate of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide is high, in which pncA gene mutation is more frequent and mutation sites are more dispersed, while rpsA gene mutation and panD gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* resistant to pyrazinamide deserve further attention.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; pyrazinamide; drug resistance; gene mutation

结核杆菌感染是结核病的病因,近年来,由于抗结核治疗不规范,多重耐药结核杆菌逐渐增多,给结核病的防治造成了很大的麻烦^[1]。抗结核治疗中,吡嗪酰胺是必不可少的一种药物,但目前发现,有很多结核病患者分离出的菌株中存在吡嗪酰胺耐药^[2]。既往研究提示,吡嗪酰胺耐药结核菌株与结核杆菌中某些基因的突变存在一定关系,如 pncA、rpsA、panD 等,但亦有研究指出上述基因突变存在一定的地域特征^[3]。因此,笔者就广东地区结核分枝杆菌的基因分型特征进行研究,以期寻找适合广东地区吡嗪酰胺耐药结核菌治疗的研究方向。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2015 年 12 月至 2018 年 2 月在本院就诊的 327 例结核病患者的痰液标本,并统计患者入院时一线药敏结果,其中多重耐药菌(MDR)94 株,非 MDR 233 株。本次研究经本院医学伦理委员会审核通过。

1.2 方法

1.2.1 痰液样本收集 患者晨起后,用清水漱口,嘱患者用力咳出肺部深部的痰液,收集于无菌样本保存管中密封。若痰液标本为脓样、干酪样或脓性黏液样性质的痰液,痰液体积 3.0~5.0 mL,则认为收集的痰液合格;若不合格,则第 2 天再次按上述方法收集痰液。所采集到的样本储存于 4 °C 中,24 h 内进行基因型检测。

1.2.2 结核分枝杆菌核酸检测 采用由上海仁度生物科技有限公司提供的结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(RNA 恒温扩增)检测痰液标本中结核分枝杆菌的基因型。取收集的痰液 1.5 mL,加入 3.0 mL 的 4% NaOH,涡旋震荡 1 min 后,室温孵育 15~20 min。取 1.0 mL 液化后的痰液标本于样品处理管内,以 13 000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL 生理盐水重悬,再次离心弃上清,加入 50 μL 稀释液重悬后为待测样品。将 2 μL 阳性对照或阴性对照加入 198 μL 稀释液中,混匀备用。将 50 μL 待测样品或阴性、阳性对照,以 300 W 超声处理 15 min,取 2 μL 处理后液体加入含有 30 μL 扩增检测的微量反应管中,将反应管置于热恒温器上 60 °C 保温 10 min,再将反应管移至恒温混匀仪 42 °C 保温 5 min 后,将预热的 10 μL 酶液加入反应管内,以 1 200 r/min 震荡 15 s 混匀混合

液。将反应管放入 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems)。反应程序设定为:荧光通道设定为 FAM,42 °C 1 min,40 个循环,每分钟收集 1 次荧光信号,共检测 40 次。实验结束后将反应管直接浸泡于 10% 84 消毒液中,严禁打开反应管,实验完成后需用 10% 84 消毒液清洁工作区和用具。当阴性对照 dt 值无数值或为 40,而阳性对照 dt≤35 时,说明本批次实验质量可,所得结果可信。当检测样品 dt≤35 时为样品阳性,检测样品 dt 无数值或为 40 时为样品阴性;对样品 dt>35~<40 的样品进行重测,当检验结果 dt<40,则样品阳性。

1.2.3 吡嗪酰胺药敏测定 采用 Bactectm MGIT 960 全自动分枝杆菌检测,按照标准操作手册,液体培养基为 pH=5.9 Middlebrook 7H9,其中吡嗪酰胺含量为 100 μg/mL,测定吡嗪酰胺药敏结果。

1.2.4 结核分枝杆菌基因测序 采用由广州蓝吉生物技术有限公司提供的磁珠法痰液 DNA 提取试剂盒,根据公司提供的说明书,从患者痰液样品中提取 DNA。将合格的 DNA 样品进行 PCR,反应体系为 KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (Kapa Biosystems) 25 μL,DNA 模版 1 μL,引物各 1 μL(10 mmol/L),水 23 μL。反应条件为 95 °C 3 min;98 °C 20 s,62 °C 15 s,72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 5 min 延伸。扩增 pncA、rpsA、panD 基因所用的引物序列见表 1。PCR 产物采用 Cycle pure kit(Omega)进行纯化后送华大基因公司进行 Sanger 测序。测序结果采用 Clustalx 和 DANstar 进行分析。

表 1 pncA、rpsA、panD 基因引物序列

基因	方向	序列(5'→3')
pncA	上游引物	TGC CAC TCG CCG GTA ACC GG
	下游引物	GGT GGC CGC CGC TCA GCT GG
rpsA	上游引物	GGC CGC AGC TGG GAC GCG GC
	下游引物	CGG TCC AGC GCT CCG TCT GC
panD	上游引物	TCA ACG GTT CCG GTC GGC TGC T
	下游引物	TAT CCG CCA CTG CTG CAC GAC CTT

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据统计和分析。计数资料以率(%)表示,组间采用 χ^2 检验进行比较;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用独立样本 t 检验进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

2 结 果

2.1 痰液结核分枝杆菌核酸检测情况及吡嗪酰胺耐药情况 本研究共收集327份结核患者痰液标本,经结核分枝杆菌核酸检测,317份痰液标本为阳性,阳性率为96.94%。根据吡嗪酰胺耐药结果,327株分离株中吡嗪酰胺耐药102株,吡嗪酰胺敏感225株,耐药率为31.19%。其中,MDR菌株的吡嗪酰胺耐药率为58.51%,而非MDR菌株的吡嗪酰胺耐药率为20.17%,MDR菌株的吡嗪酰胺耐药率显著高于非MDR菌株($P<0.05$)。见表2。

表2 吡嗪酰胺药敏检测结果

菌株	n	吡嗪酰胺敏感 (n)	吡嗪酰胺耐药 (n)	吡嗪酰胺 耐药率(%)
MDR菌株	94	39	55	58.51
非MDR菌株	233	186	47	20.17
χ^2				45.870
P				0.000

2.2 pncA突变情况分析 225株吡嗪酰胺敏感株中未发现pncA突变,102株吡嗪酰胺耐药株中有67株发现pncA基因突变,突变率为65.69%。55例吡嗪酰胺耐药的MDR菌株中,发现pnaA突变有45例,显著高于吡嗪酰胺耐药的非MDR菌株pncA基因突变率22/47($\chi^2=13.781, P=0.000$)。见表3。

表3 吡嗪酰胺耐药的MDR菌株的pncA基因突变情况

DNA位点	突变情况	氨基酸位点	氨基酸突变情况	菌株数 (n)
29	CAG→CCG	10	谷氨酰胺→脯氨酸	3
139	ACC→GCC	47	苏氨酸→丙氨酸	2
185	CCC→CAG	62	脯氨酸→谷氨酸	2
196	TCG→CCG	66	丝氨酸→脯氨酸	3
226	ACT→CCT	76	苏氨酸→脯氨酸	2
242	TTC→GTC	81	苯丙氨酸→缬氨酸	1
246,246	CAT→CGG	82	组氨酸→精氨酸	2
280	TTC→CTC	94	苯丙氨酸→亮氨酸	1
283	AAG→GAG	96	赖氨酸→谷氨酸	3
395	GGT→GCT	132	甘氨酸→丙氨酸	1
403	ACC→CCC	135	苏氨酸→脯氨酸	2
416	GTG→GCG	139	缬氨酸→甘氨酸	1
476	CTG→CGG	159	亮氨酸→精氨酸	4
502	ACC→CCC	168	苏氨酸→脯氨酸	3
524,525	ATG→AGA	175	蛋氨酸→精氨酸	3
28	TAC→TAG	10	转录终止	1
309	TAC→TAG	103	转录终止	1
130	插入C	—	移码突变	1

续表3 吡嗪酰胺耐药的MDR菌株的pncA基因突变情况

DNA位点	突变情况	氨基酸位点	氨基酸突变情况	菌株数 (n)
139	插入C	—	移码突变	1
212	插入T	—	移码突变	1
243	插入A	—	移码突变	1
341	缺失AC	—	移码突变	1
342	缺失G	—	移码突变	1
376	缺失GA	—	移码突变	1
392	插入C	—	移码突变	1
408	插入A	—	移码突变	1
409	插入GC	—	移码突变	1

注:—表示无氨基酸位点

2.3 rpsA突变情况分析 102株吡嗪酰胺耐药株中检测出5株rpsA突变,突变率为4.90%;225株吡嗪酰胺敏感株中检测出1株rpsA突变,突变率为0.44%。吡嗪酰胺耐药菌株的rpsA突变率显著高于吡嗪酰胺敏感菌株($\chi^2=7.476, P=0.006$)。见表4。

表4 吡嗪酰胺耐药菌株的rpsA基因突变情况

DNA位点	突变情况	氨基酸位点	氨基酸突变情况	菌株数
1420	CGG→TGG	474	精氨酸→色氨酸	1
1421	CGG→CTG	474	精氨酸→亮氨酸	1
1299	GAG→GAC	433	谷氨酸→天冬氨酸	1
1302	插入C	—	移码突变	1
1377	插入GA	—	移码突变	1

注:—表示无氨基酸位点

2.4 panD突变情况分析 105株吡嗪酰胺耐药株中检测到1株panD突变,为G419→A突变,突变率为0.95%。吡嗪酰胺敏感株中未检测到panD突变。

3 讨 论

结核分枝杆菌是引起结核病的病原菌,可侵犯全身各个器官,以肺结核最为常见。而我国的结核病患者例数位于全世界第2,结核病对国家卫生和社会经济都造成了严重的负担^[4]。由于药物使用不规范或其他原因,近年来多重耐药性结核杆菌的发病率越来越高,增加了结核病的发病率和死亡率^[5]。目前,检验科多采用细菌培养+药敏试验,耗时较长,无法让患者得到及时的治疗。因此,通过深入了解结核分枝杆菌基因组和耐药的分子机制,寻找更为快速的、准确的诊断结核分子杆菌和药敏检测的方式是十分必要和紧迫的。

吡嗪酰胺能够渗透入吞噬细胞后进入结核杆菌内,使其内在的酰胺酶脱去酰胺基,转化为吡嗪酸而发挥抗菌作用,此外,吡嗪酰胺还能取代烟酰胺阻止脱氢作用,妨碍结核杆菌对氧的利用,影响细菌的正常代谢,造成细菌死亡^[6-7]。该药在抗结核治疗中

起到了无可代替的作用。但近年来的研究显示,对MDR 结核杆菌吡嗪酰胺的耐药率较高,显著高于非MDR 结核杆菌的吡嗪酰胺耐药率^[8],与本研究的结果相近。国内外的研究报道提示,吡嗪酰胺耐药性的产生与 pncA 突变造成吡嗪酰胺活性降低有关^[9]。本研究收集广东地区结核病患者的样本进行分析,发现吡嗪酰胺耐药株中 pncA 的基因突变率为 65.69%,略低于国内报道的 80.00% 左右的基因突变率^[10],这一结果提示 pncA 基因突变存在一定的地区差异及在特定地区调查 pncA 基因突变的必要性。有研究指出,吡嗪酰胺耐药的 pncA 基因突变位点较为集中,与吡嗪酰胺二级结构的酶活性位点、结合位点等有关^[11]。但本研究中, pncA 基因突变位点未见明显的聚集,这提示吡嗪酰胺耐药可能存在未知的分子机制,或吡嗪酰胺存在未知的结构变化。

除了 pncA 基因, rpsA 和 panD 基因也与吡嗪酰胺耐药存在很大的关系^[12]。本研究中检测到 5 株 rpsA 基因突变和 1 株 panD 基因突变的吡嗪酰胺耐药菌株。本研究中检测到 rpsA 基因突变有部分位点与既往的报道相似,但也有部分位点与既往的报道不同,提示 rpsA 基因突变也可能存在地域特征^[13-14]。而本研究中检测到 1 株 panD 基因突变, G419→A, 与国内的报道相似^[15],提示 panD 基因与 panA、rpsA 基因不同, panD 基因的保守性更强,可能作为治疗结核杆菌,特别是吡嗪酰胺耐药性结核杆菌的治疗靶点。

4 结 论

本研究发现,在中国广东地区,结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药率较高,其中 pncA 基因突变较多,突变位点较为分散;而吡嗪酰胺耐药结核分枝杆菌中 rpsA 基因突变和 panD 基因突变均值得进一步关注。本研究揭示了我国广东地区结核分枝杆菌的基因分型特征,为临床治疗用药提供了参考依据。

参考文献

- [1] 宋艺,万李,陈双双,等.中国 6 个省份结核分枝杆菌耐药状况及影响因素分析[J].中华流行病学杂志,2016,37(7):945-948.
- [2] 胡严杰,黄海荣.结核分枝杆菌对吡嗪酰胺耐药的检测方法研究与进展[J].中国防痨杂志,2016,38(9):761-764.
- [3] SHEEN P, REQUENA D, GUSHIKEN E, et al. A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 769.
- [4] 黄新春,郭卉欣,巫株华,等.广东省耐药监测点 2015 年结核分枝杆菌流行病学研究[J].中华结核和呼吸杂志,2017,40(5):334-338.
- [5] 刘彬彬,胡培磊,龚道方,等.湖南省涂阳肺结核患者结核分枝杆菌耐药谱及其影响因素[J].中国感染控制杂志,2016,15(2):73-78.
- [6] 曾瑞通,陈文胜,刘振扬,等.吡嗪酰胺不同给药方案治疗新发涂阳肺结核的疗效观察[J].中国医药科学,2017,7(12):32-35.
- [7] 曹志敏,陈玲.结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药相关基因研究进展[J].中国人兽共患病学报,2017,33(10):923-926.
- [8] 朱大冕,胡代玉,刘洁,等.重庆地区耐多药结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药基因突变的特征分析[J].中国防痨杂志,2018,88(2):177-182.
- [9] BADDAM R, KUMAR N, WIELER L H, et al. Analysis of mutations in pncA reveals non-overlapping patterns among various lineages of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):4628.
- [10] 李锋,卢永辉,李涛,等.吡嗪酰胺耐药的结核病患者临床分析[J/CD].新发传染病电子杂志,2017,2(1):25-27.
- [11] LI H, CHEN J, ZHOU M, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and pyrazinamide susceptibility related to pncA mutations in sputum specimens through an integrated gene-to-protein function approach[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(1):260-267.
- [12] RAMIREZ-BUSBY S M, RODWELL T C, FINK L, et al. A multinational analysis of mutations and heterogeneity in PZAse, RpsA, and PanD associated with pyrazinamide resistance in M/XDR *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):3790.
- [13] DILLON N A, PETERSON N D, FEAGA H A, et al. Anti-tubercular activity of pyrazinamide in independent of trans-translation and rpsA[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 6135.
- [14] GU Y, YU X, JIANG G, et al. Pyrazinamide resistance among multidrug-resistant tuberculosis clinical isolates in a national referral center of China and its correlations with pncA, rpsA, and panD gene mutations[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 84(3):207-211.
- [15] 罗振华,钱雪琴,范齐文,等.结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药相关分子特征分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2015,35(9):660-665.

(收稿日期:2019-01-15 修回日期:2019-05-11)