

论著·临床研究

广西钦州地区结核分枝杆菌相关耐药基因变异特征分析*

李崇建¹, 鲍金圭^{1△}, 陈焯彬², 李仕娟¹, 吴海松², 梁 玲¹

(广西医科大学第十附属医院暨钦州市第一人民医院:1. 检验科;2. 感染科, 广西钦州 535000)

摘要:目的 分析广西钦州地区结核分枝杆菌(MTB)相关耐药基因 rpoB、katG、inhA、rpsL 及 embB 的变异特征。方法 应用聚合酶链式反应(PCR)-反向斑点杂交法对 237 例 MTB-DNA 阳性的痰液标本进行结核分枝杆菌 5 种常见耐药突变基因检测。结果 对 4 种一线抗结核药物耐药菌株占 30.38%, 其中单耐利福平(RIF)占 2.53%, 单耐异烟肼(INH)占 13.92%, 仅对链霉素(STR)耐药占 3.80%, 对两种及以上抗结核药物耐药(PR)占 3.80%, 同时对 RIF 和 INH 耐药(MDR)占 6.33%。5 种耐药基因的 13 个突变位点中, INH inhA 基因的-15M 位点最多见, 其次为 RIF 的 S531L 位点和 STR 的 43M 位点。结论 广西钦州地区的主要耐药菌株为 INH 耐药, 其中又以 inhA 基因突变为主。

关键词:结核分枝杆菌; 耐药基因; 基因突变; PCR-反向斑点杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.011

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)08-0936-03

文献标识码:A

The mutation characteristics of drug-resistance of Mycobacterium tuberculosis in Qinzhou, Guangxi

LI Chongjian¹, BAO Jingui^{1△}, CHEN Zhuobin², LI Shijuan¹, WU Haisong², LIANG Ling¹

(1. Department of Clinical Laboratory/Qinzhou First People's Hospital; 2. Department of Infectious Diseases, the Tenth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Qinzhou, Guangxi 535000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the variation characteristics of rpoB, katG, inhA, rpsL and embB related genes of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in Qinzhou, Guangxi. **Methods** PCR reverse point hybridization was used to detect 5 common resistance mutants of Mycobacterium tuberculosis in 237 MTB-DNA positive sputum samples. **Results** Among 237 cases of tuberculosis patients, 72 cases (30.38%) were resistant to the four kinds of anti-TB drugs. The resistance mutation rate of rifampin, isoniazid and streptomycin was 2.53%, 13.92%, 3.80%. The top 5 gene mutation detection loci of Mycobacterium tuberculosis were -15M, S531L and 43M. **Conclusion** The main drug-resistant strains are isoniazid resistance, and the mutation of inhA gene were the major one in Qinzhou, Guangxi.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; drug-resistance; gene mutation; reverse dot blot hybridization technique construct specific PCR reaction system

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)感染引起的一种慢性疾病, 中国仍然是全球 22 个结核病高负担国家之一。结核分枝杆菌临床菌株的耐药率, 尤其是耐多药率的逐年上升, 是耐药结核病产生的主要原因。目前临床耐药结核病主要有以下 4 种情况: (1) 单耐药(MR): 结核病患者感染的结核分枝杆菌经体外药敏试验被证实仅对一种一线抗结核药物耐药。 (2) 多耐药(PR): 结核病患者感染的结核分枝杆菌经体外药敏试验被证实对一种以上的一线抗结核药物耐药[不包括同时对异烟肼(INH)和利福平(RIF)耐药]。 (3)

耐多药(MDR): 结核病患者感染的结核分枝杆菌经体外药敏试验被证实至少同时对 INH 和 RIF 耐药。 (4) 广泛耐多药(XDR): 结核病患者感染的结核分枝杆菌经体外药敏试验被证实耐多药的基础上至少同时对一种氟喹诺酮类和一种二线注射类抗结核药物耐药^[1]。近年来, 耐药结核病呈现增多趋势, 因此, 快速、准确地检测结核分枝杆菌耐药基因对结核病的诊断、治疗及预防有着重要意义。本研究主要应用聚合酶链式反应(PCR)-反向斑点杂交技术, 对钦州市第一人民医院感染科收治入院后确诊的肺结核患者痰

* 基金项目: 钦州市科学研究与技术开发计划项目(201514918)。

作者简介: 李崇建, 男, 主管技师, 主要从事临床分子诊断与技术研究。 △ 通信作者, E-mail: 179944473@qq.com。

本文引用格式: 李崇建, 鲍金圭, 陈焯彬, 等. 广西钦州地区结核分枝杆菌相关耐药基因变异特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8):

液标本进行 4 种一线抗结核药物[RIF、INH、链霉素(STR)及乙胺丁醇(EMB)]的耐药基因检测,涉及 5 种常见耐药基因(rpoB、katG、inhA、rpsL 及 embB)的 13 个位点。通过进一步探讨这些基因突变发生的频率及分布特点,为该地区耐药结核病的防治提供重要的科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1 月至 2017 年 6 月经钦州市第一人民医院感染科收治入院的疑似肺结核患者作为研究对象,共 1 410 例,其中男性 952 例,女性 458 例,年龄 17~93 岁。其诊断依据 2001 年中华医学会结核病学分会制定的《肺结核诊断和治疗指南》^[2]。本研究符合钦州市第一人民医院医学伦理委员会的规定,且所有研究内容均征得患者同意并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 HFsafe-1200TE 生物安全柜(力新仪器(上海)有限公司);DA-7600 实时荧光定量分析仪(广州中山达安公司);亚能 YN-H6 恒温杂交仪(亚能生物技术(深圳)有限公司);MTB-DNA 检测试剂盒(广州中山达安公司);MTB 耐药突变基因检测试剂盒(深圳亚能生物技术有限公司);Min-1524 高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 结核分枝杆菌 DNA 检测 所有研究对象均留取晨痰标本送检,共 1 410 例。标本采集时嘱患者清晨漱口后由深部咳出 2~3 mL 至无菌塑料瓶中送检。严格按照试剂说明书操作。其扩增程序如下:95 ℃ 2 min 预变性,95 ℃ 45 s,55 ℃ 120 s,10 个循环;95 ℃ 45 s,55 ℃ 120 s,30 个循环。阳性标本置-20 ℃冰箱保存备用。

1.3.2 MTB 耐药基因检测 采用亚能生物技术(深圳)有限公司生产的 MTB 耐药突变基因检测试剂盒,对上述 MTB-DNA 阳性的标本严格按照说明书进行杂交。

1.4 统计学处理 利用 SPSS16.0 统计分析软件进行数据处理与分析,计数资料采用率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 结核杆菌耐药情况分析 237 例 MTB-DNA 阳性的肺结核患者中,对 RIF、INH、STR 及 EMB 4 种抗结核药物均敏感的有 165 例(69.62%);仅对 RIF 耐药的有 6 例(2.53%),仅对 INH 耐药的有 33 例(13.92%),仅对 STR 耐药的有 9 例(3.80%),对 2 种及以上抗结核药物耐药(PR)的有 9 例(3.80%),同时对 RIF 和 INH 耐药(MDR)的有 15 例(6.33%),未见单独对 EMB 耐药的情况。见表 1。

表 1 237 例 MTB 耐药性分析		
检测结果	菌株数(n)	检出率(%)
敏感	165	69.62
单耐 RIF	6	2.53
单耐 INH	33	13.92
单耐 STR	9	3.80
单耐 EMB	0	0.00
耐多药(MDR)	15	6.33
多耐药(PR)	9	3.80

2.2 肺结核患者耐药菌株中各突变位点耐药特征情况 72 例耐药标本中,分别以对单个药物耐药计算,则对 RIF、INH、STR 及 EMB 耐药的分别为 27 例(37.5%)、51 例(70.83%)、21 例(29.17%)及 3 例(4.17%),其中以 INH 耐药最多见。突变位点检出前 4 位分别为-15M、S531L、43M 及 315M。其中 INH 耐药突变位点以-15M(72.55%)为主,RIF 耐药突变位点以 S531L(59.26%)较为多见,而 STR 常见突变位点为 43M(76.19%)。见表 2。

表 2 肺结核患者耐药菌株中各突变位点耐药特征情况				
药物	耐药基因	突变位点	例数(n)	占该药物的突变率(%)
RIF	rpoB	D516V	1	3.70
		D516G	2	7.41
		H526Y	5	18.52
		H526D	2	7.41
		S531L	16	59.26
		S531W	1	3.70
INH	katG	315M	14	27.45
		-15M	37	72.55
STR	rpsL	43M	16	76.19
		88M	5	23.81
EMB	embB	306M1	0	0.00
		306M2	3	100.00

注:D516V 表示 rpoB 基因第 516 密码子的天冬氨酸突变为缬氨酸。其他氨基酸含义:G-甘氨酸、H-组氨酸、Y-酪氨酸、S-丝氨酸、L-亮氨酸、W-色氨酸。315M 及-15M 分别表示 katG 基因第 315 密码子和 inhA 基因第-15 密码子的突变。43M 和 88M 分别代表 rpsL 基因第 43 和 88 密码子发生突变。306M1、306M2 和 306M3 代表 embB 基因第 306 密码子发生不同类型的突变

3 讨 论

细菌产生耐药性的机制主要有 4 种:(1)屏障机制;(2)酶类降解或失活;(3)药物的激活/代谢途径被修饰;(4)药物靶点被修饰或靶点扩大化^[3]。结核分枝杆菌对 4 种一线抗结核药物的耐药性均涉及药物靶点被修饰,INH 的耐药性还与活化减低相关。近年来,耐药 MTB 逐年上升,其产生的主要耐药机制是基

因突变。本研究采用的 PCR-反向点杂交技术是集 PCR 技术的高敏感性,反向斑点杂交的高特异性及膜芯片技术的高通量为一体的快速基因诊断方法。它可以同时针对 4 种一线抗结核药物的 5 种常见耐药基因的 13 个突变位点进行检测,并在 8 h 内获得结果。

大量研究表明,rpoB 基因突变与 RIF 耐药高度相关。本次研究结果显示,钦州地区 rpoB 基因的突变位点主要为 S531L (59.26%),其次是 H526Y (18.52%),这与福建、江西、湖南及广西百色等地区的研究结果相似^[4-7]。

INH 是一种前体药物,在结核杆菌体内可被 katG 基因编码的过氧化氢酶-过氧化物酶激活,产生活性氧及自由基等物质,攻击菌体内的药物靶点,发挥杀菌作用。katG 基因发生突变时,过氧化物酶活性将降低或丧失,INH 活化受阻,从而导致其耐药性的产生^[8]。inhA 基因的点突变和(或)缺失可导致 inhA 基因表达增强,从而使烯酰基还原酶数量增多并超过药物的抑制作用导致菌株耐药性产生^[9]。ahpC 基因编码烷基过氧化氢还原酶,参与氧化-应激反应。本研究发现,广西钦州地区 INH 耐药以 inhA 基因的-15M 位点突变最为常见,这与浙江、陕西、重庆及江苏等多个地区结果不同^[10-13],而与黑龙江相似^[14]。由此说明 inhA 基因突变可能存在地域差异,这或许与地理环境及人种有关,但是需要通过多地区、多中心的大样本合作研究加以证实。

STR 为氨基糖苷类抗菌药物,是结核病联合化疗的重要成员。其耐药机制产生与 rpsL 基因(编码核糖体蛋白 S12)和 rrs 基因(编码 16S rRNA)突变有关,其中 rpsL 基因的常见突变位点为 43 和 88 位密码子^[15]。EMB 是一种人工合成的阿拉伯糖类物质,主要作用于阿拉伯糖基转移酶,干扰细胞壁阿拉伯半乳糖的合成^[16]。研究表明 EMB 耐药与 emb 基因簇 3 个邻近基因 embA、embB、embC 的突变相关。本研究中,rpsL 基因的突变以 43 位点为主,占 76.19%。而 embB 基因突变较少,只有 3 例,可能与本次研究标本量不足有关,需要后续加大样本再次研究。

综上所述,广西钦州地区的主要耐药菌株为 INH 耐药,其中又以 inhA 基因突变为主。PCR-反向斑点杂交技术用于 MTB 耐药基因检测具有高灵敏度、高特异性及快速、可靠等优点,适合于临床开展。

参考文献

- [1] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2015)[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(5): 421-469.
- [2] 中华医学会结核病学分会. 结核病诊断和治疗指南[J].

中华结核和呼吸杂志, 2001, 24: 70-74.

- [3] COHEN K A, BISHAI W R, PYM A S. Molecular basis of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(3): 1-16.
- [4] 许榕青, 李丹, 林银霞, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性临床应用评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(1): 43-48.
- [5] 彭亦平, 宗佩兰, 辛茶香, 等. 应用 PCR-反向点杂交技术快速检测结核分枝杆菌耐药突变基因[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(8): 619-622.
- [6] 邓叶华, 向延根, 马小华, 等. 基因芯片法用于检测长沙地区结核分枝杆菌耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(22): 3223-3226.
- [7] 韦红玉, 隆昕颖, 凌俊, 等. 广西百色地区结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 的突变特征分析[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(5): 679-681.
- [8] COHEN K A, BISHAI W R AND PYM A S. Molecular basis of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(3): 36.
- [9] MACHADO D, COUTO I, PERDIGAO J, et al. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. PLoS One, 2012, 7(4): 34538.
- [10] 徐凯进, 嵇仲康, 胡海洋, 等. 浙江省 12 个区(县)分枝杆菌菌种鉴定及耐药相关基因特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2017, 39(2): 154-157.
- [11] 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.
- [12] 陈国会, 冯大山, 王秀丽, 等. 应用基因芯片检测系统诊断结核分枝杆菌感染及耐药基因突变的临床研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(5): 638-640.
- [13] 芮冬妹, 朱珍, 樊燕, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌对异烟肼耐药性的结果分析及临床价值[J]. 广西医学, 2017, 39(1): 98-99.
- [14] 王敬丽, 李迪, 赵丽娜, 等. 黑龙江省耐多药结核分枝杆菌临床分离株耐药基因变异特征[J]. 国际遗传学杂志, 2013, 36(5): 196-200.
- [15] ARJOMANDZADEGAN M, GRAVAND S. Analysis of rpsL and rrs genes mutations related to streptomycin resistance in Mdr and Xdr clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis [J]. Tuberk Toraks, 2015, 63(4): 235-242.
- [16] ZHAO L L, SUN Q, LIU H C, et al. Analysis of embCAB mutations associated with ethambutol resistance in multi-drug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(4): 2045-2050.

(收稿日期: 2017-09-15 修回日期: 2017-11-05)