

论著·临床研究

长沙某医院结核分枝杆菌耐药基因分布情况分析\*

潘建华,石国民,马小华,向延根<sup>△</sup>

(长沙市中心医院检验科,湖南长沙 410004)

**摘要:****目的** 了解长沙某医院结核分枝杆菌(MTB)耐药基因的分布情况。**方法** 分析长沙市中心医院 2014 年 7 月至 2017 年 3 月分离的 1 981 株 MTB 耐药基因 *ropB*、*KatG* 和 *inhA* 的分布情况。**结果** 1 981 例 MTB 感染患者中共检出 *ropB* 基因突变型 335 株,突变率为 16.91%(335/1 981)。*ropB* 基因位点突变率由高至低依次为 531[50.75%(170/335)]、516[21.19%(71/335)]、526[17.0%(157/335)]、511[14.33%(48/335)]、513[2.69%(9/335)]、533[2.39%(8/335)];检出 *KatG* 突变株 310 株,突变率为 15.65%(310/1 981);*inhA* 突变型 68 株,突变率为 3.43%(68/1 981),合计耐异烟肼基因突变率为 18.6%(369/1 981)。其中 *KatG* AGC→ACC 突变型占 79.95%(295/369)。**结论** *ropB* 基因 531、516、526 和 511 位点突变和 *KatG* AGC→ACC 突变是导致长沙某院结核病利福平和异烟肼耐药的主要因素,基因芯片技术可作为该院 MTB 耐药基因的快速筛选方法。

**关键词:**分枝杆菌,结核; 抗药性; 基因; 突变; 寡核苷酸序列分析  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.009 **中图法分类号:**R378.911 ;R969.3  
**文章编号:**1673-4130(2019)01-0034-03 **文献标识码:**A

Distribution of Mycobacterium tuberculosis resistance genes in a hospital in Changsha\*

PAN Jianhua,SHI Guomin,MA Xiaohua,XIANG Yangen<sup>△</sup>  
(Changsha Central Hospital,Changsha 410004,China)

**Abstract:****Objective** To study the distribution of MTB resistance genes in Changsha Central Hospital.  
**Methods** Totally 1981 strains of MTB were identified in Changsha Central Hospital from July 2014 to March 2017,resistant genes *ropB*、*KatG* and *inhA* were screened by DNA microarray. **Results** A total of 335 *ropB* mutant strains were detected,with a mutation rate of 16.91% (335/1981). Site mutation rates were followed by 531 (171/335,50.75%),516 (71/335,21.19%),526 (57/335,17.01%),511 (48/335,14.33%),513 (9/335,2.69%),and 533 (8/335,2.39%); The *KatG* mutant was detected in 310 strains,the mutation rate was 15.65% (310/1981);the *inhA* mutant was 68,and the mutation rate was 3.43% (68/1981). The total mutation rate of isoniazid resistant genes was 18.6%(369/1981). *KatG* AGC→ACC mutant accounted for 79.95% (295/369). **Conclusion** Mutations of the 531,516,526 and 511 loci of *ropB* gene and mutations of *KatG* AGC→ACC are the main factors resulting RFP and isoniazid resistance in tuberculosis in Changsha Central Hospital. DNA microarray can be used as a rapid screening method for MTB resistance genes in Changsha.

**Key words:** Mycobacterium,tuberculosis; drug resistance; genes; mutation; oligonucleotide array sequence analysis

WHO 2016 年结核病报告指出,我国结核病患者数量居世界第 3 位,是世界上 30 个结核病高负担国家之一<sup>[1]</sup>。据 WHO 估算,中国每年新发结核病患者数量多达 900 000 例,每年新发耐多药结核病患者 70 000 例。耐药结核分枝杆菌(MTB)的传播是防控结核病的主要威胁之一,治疗每例耐多药结核患者的

费用是治疗药物敏感患者费用的 20 倍。快速检测 MTB 及其耐药性可精准治疗患者,缩短病程,减轻患者痛苦,有效降低耐药菌株的传播。为了解本院 MTB 的耐药基因 *ropB*、*KatG* 和 *inhA* 流行病学情况,探索适合本院快速筛选 MTB 耐药菌株的方法,本研究对本院 2014 年 7 月至 2017 年 3 月基因芯片技术

\* 基金项目:国家“十二五”重大专项(2013ZX10005004)。  
作者简介:潘建华,女,主任技师,主要从事分子诊断学研究。 <sup>△</sup> 通讯作者,;E-mail:xiangyangen@126.com。  
本文引用格式:潘建华,石国民,马小华,等.长沙某医院结核分枝杆菌耐药基因分布情况分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(1):34-36.

检测 MTB 耐药基因的数据进行了回顾性分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院 2014 年 7 月至 2017 年 3 月分离的 MTB 1 981 株。

1.2 仪器与试剂 北京奥博生物生产的 Extractor36 核酸快速提取仪、HybSet 基因微阵列芯片杂交盒、SlideWasher™8 芯片洗干仪和 LuScan10K-B 微阵列芯片扫描仪等;PCR 扩增仪为美国 ABI 7300;MTB 耐药基因检测试剂由北京博奥生物生产。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 从 Middlebrook7H9 液体培养基中吸取相当于 1 个麦氏单位浊度的菌悬液 15 μL 于核酸提取管中,加入 80 μL 核酸提取液试剂,于 Extractor36 核酸快速提取仪振荡 5 min,95 ℃金属浴 5 min,5 000 r/min 离心 1 min,将收获的核酸提取液放置于-20 ℃暂存。

1.3.2 核酸扩增 PCR 扩增试剂 1、2 和 3 平衡至室温,瞬时离心至管底,分装成每管 18 μL,分别加入模板 DNA 2 μL。扩增程序:37 ℃ 600 s;94 ℃ 600 s;94℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;94 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,10 个循环;72 ℃ 420 s;置于冰水浴中。

1.3.3 芯片杂交 按 9 μL 杂交缓冲液加 3 μL 扩增产物的比例配制杂交反应物,加热至 95 ℃变性 5 min,立即冰水浴 5 min。产物 1 为产物对照,与 2 种微阵列均进行杂交。产物 2 为 rpoB 基因的扩增产物,与利福平微阵列相对应;产物 3 为 katG 基因及 inhA 基因启动子的扩增产物,与异烟肼微阵列相对应。取 13.5 μL 混合液加入杂交芯片加样孔中,置入 HybSet 芯片杂交盒中 50 ℃杂交 2 h。

1.3.4 洗涤、干燥及扫描 依次以 2×标准枸橼酸水(SSC)+0.2%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.2×SSC 各振荡洗涤 3 min,800 r/min 离心 5min,甩干后扫描、判读结果。

1.3.5 质量控制 每次扩增时均使用阳性对照和阴性对照,其中阳性对照可用于 PCR 扩增和杂交过程的质控,阴性对照可用于监测环境及操作过程中的污染情况;每张芯片上均设置空白对照、阴性和阳性内对照、表面化学质控探针、杂交阳性外对照探针及野生型探针,用于监控杂交过程。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件对数据进行分析,计数资料以率(%)表示,采用描述性统计分析。

2 结果

2.1 一般情况 2014 年 7 月至 2017 年 3 月共检测 MTB 耐药基因患者 1 981 例,其中男 1 330 例

(67.14%),女 651 例(32.86%),除 30~<40 岁年龄组男女比例相当外,其余各年龄组男性均明显多于女性。见表 1。

表 1 不同性别、年龄结核病患者情况比较[n(%),n=1 981]

| 年龄(岁)  | 男            | 女          | 合计            | 男女比例 |
|--------|--------------|------------|---------------|------|
| ≥70    | 183(9.24)    | 82(4.14)   | 2 265(13.38)  | 2.23 |
| 60~<70 | 214(10.80)   | 78(3.94)   | 2 292(14.74)  | 2.74 |
| 50~<60 | 242(12.22)   | 94(4.75)   | 3 326(16.96)  | 2.57 |
| 40~<50 | 177(8.93)    | 76(3.84)   | 253(12.77)    | 2.33 |
| 30~<40 | 119(6.01)    | 103(5.20)  | 222(11.21)    | 1.16 |
| 20~<30 | 310(15.65)   | 148(7.47)  | 458(23.12)    | 2.09 |
| <20    | 85(4.29)     | 70(3.53)   | 155(7.82)     | 1.21 |
| 合计     | 1 331(67.14) | 651(32.86) | 1 981(100.00) | 2.04 |

2.2 MTB ropB 耐药基因检出结果 1 981 株 MTB 经基因芯片技术检测为 ropB 野生型 1 646 株,突变型 335 株,突变率为 16.91%(335/1 981)。共检测耐利福平 rpoB 基因 6 个位点,突变类型 13 种。突变位点突变率由高至低依次为 531[50.75%(170/335)]、516 [21.19%(71/335)]、526 [17.0%(157/335)]、511 [14.33%(48/335)]、513 [2.69%(9/335)]、533 [2.39%(8/335)]。突变型分布见表 2。

表 2 335 株耐利福平 MTB ropB 基因突变类型分布情况

| 突变位点 | 突变型     | 突变频数(n) | 密码子突变率(%) | 位点突变率(%) |
|------|---------|---------|-----------|----------|
| 511  | CTG→CCG | 48      | 14.33     | 14.33    |
| 513  | CAA→CCA | 4       | 1.19      | 2.68     |
|      | CAA→AAA | 5       | 1.49      |          |
| 516  | GAC→GGC | 9       | 2.69      | 21.19    |
|      | GAC→GTC | 38      | 11.34     |          |
|      | GAC→TAC | 24      | 7.16      |          |
| 526  | CAC→CGC | 8       | 2.39      | 17.01    |
|      | CAC→CTC | 5       | 1.49      |          |
|      | CAC→GAC | 21      | 6.27      |          |
|      | CAC→TAC | 23      | 6.87      |          |
| 531  | TCG→TGG | 3       | 0.90      | 50.75    |
|      | TCG→TTG | 167     | 49.85     |          |
| 533  | CTG→CCG | 8       | 2.39      | 2.39     |

2.3 MTB 异烟肼耐药基因检出结果 1 981 株 MTB 经基因芯片技术检测共检测出 KatG 野生型 1 670 株,KatG 突变株 310 株,突变率为 15.65%(310/1 981); inhA 野生型 1 913 株,inhA 突变型 68 株,突变率为 3.43%(68/1 981),9 株为二者合并突变株。总突变率为 18.6%(369/1 981),其中 KatG AGC→

ACC 突变型占有耐异烟肼 MTB 突变总数的 79.95%(295/369)。2 个基因的突变型分布见表 3。

表 3 369 株耐异烟肼 MTB KatG 和 inhA 基因突变谱及突变率

| 基因   | 突变位点 | 突变型       | 突变频数<br>(n) | 密码子<br>突变率(%) | 位点<br>突变率(%) |
|------|------|-----------|-------------|---------------|--------------|
| KatG | 315  | AGC→AAC   | 15          | 4.07          | 84.01        |
|      |      | AGC→ACC   | 295         | 79.95         |              |
| inhA | -15  | →(C→T)突变型 | 68          | 18.43         | 18.21        |

3 讨 论

基因芯片技术是近年来兴起的 MTB 耐药基因检测新技术,在国内多中心验证结果显示,该方法检测利福平耐药灵敏度和特异度为 87.56%和 97.95%,检测异烟肼耐药灵敏度和特异度为 80.34%和 95.82%<sup>[2]</sup>。基因芯片法对利福平耐药基因的检测与表型检测符合率达 95.0%以上<sup>[3]</sup>。

rpoB 基因突变绝大部分集中在 RRDR 81 bp 的密码子上<sup>[4-5]</sup>。本院 531 位点突变率最高,占 50.75%,与青岛地区 52.6%<sup>[6]</sup>接近,低于深圳的 76.3%<sup>[7]</sup>;ropB 基因突变率为 16.91%(335/1 981),略高于作者 2016 年进行的耐药表型的研究数据(13.57%)<sup>[8]</sup>,低于贵州的 20.16%<sup>[9]</sup>。

异烟肼耐药相关突变发生率具有较大的地区差异性。本研究结果显示,异烟肼耐药基因 KatG 突变率为 15.65%,inhA 突变率为 3.43%,二者合计异烟肼耐药基因突变率为 18.6%,略高于作者 2016 年进行的耐药表型的研究数据(14.18%)<sup>[8]</sup>,与贵州类似<sup>[10]</sup>。KatG AGC→ACC 突变率为 79.95%,inhA 突变率为 18.7%。与青岛<sup>[6]</sup>一致,接近深圳地区的 84.6%<sup>[11]</sup>,高于福州的 70.7%<sup>[12]</sup>、浙江的 69.3%<sup>[13]</sup>和武汉的 60.9%<sup>[14]</sup>。

耐药表型与基因型之间不一致的原因可能有:(1)芯片没有覆盖所有的突变位点或突变基因型;(2)芯片检测到的突变型可能是未引起耐药的同义或错义突变;(3)传统药敏试验检测以临界水平判断耐药,而基因芯片法能检测到比传统药敏试验临界水平更低的低度耐药突变菌株。这些因素均可能对最终结果产生影响。

4 结 论

ropB 基因 531、516、526 和 511 位点突变和 KatG G→C 突变是导致长沙市中心医院 MTB 利福平和异烟肼耐药的主要因素,基因芯片技术可作为本院 MTB 耐药基因的快速筛选方法。

参考文献

[1] World Health Orgomization. Global tubortulosis 2016 [M]. Geneva:World Mealth Organization,2017.

[2] PANG Y,XIA H,ZHANG Z,et al. Multicenter evaluation of genechip for detection of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51 (6):1707-1713.

[3] 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.

[4] KHOSRAVI A D,GOODARZI H,ALAVI S M. Detection of genomic mutations in katG,inhA and rpoB genes of Mycobacterium tuberculosis isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. Braz J Infect Dis,2012,16(1):57-62.

[5] HEYSELL S K,HOUPT E R. The future of molecular diagnostics for drug-resistant tuberculosis[J]. Expert Rev Mol Diagn,2012,12(4):395-405.

[6] 李同霞,江国峰,郝文嘉,等. 结核分枝杆菌临床分离株利福平和异烟肼耐药性检测方法比较[J]. 中国现代医学杂志,2016,26(24):24-27.

[7] 王峰,桂静,赵广录,等. 基因芯片检测结核分枝杆菌利福平异烟肼耐药性的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(12):1125-1129.

[8] 潘建华,罗丹,石国民,等. 2012—2015 年长沙地区肺结核患者结核分枝杆菌耐药状况分析[J]. 现代预防医学, 2016,43(8):1499-1501.

[9] 欧维正,骆科文,陈峥宏,等. 贵州地区结核分枝杆菌利福平耐药相关基因 rpoB 突变特征分析[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(10):833-835.

[10] 欧维正,陈峥宏,陈静,等. 基因芯片技术检测贵州省结核分枝杆菌耐药基因 KatG 和 inhA[J]. 中国人兽共患病学报,2015,31(7):655-658.

[11] 桂静,王峰. 深圳地区结核分枝杆菌耐药分离株分子特征与表型特征相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2010,30(5):466-471.

[12] 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.

[13] 戎奇吉,吕火祥,孙爱华. 基因芯片快速检测结核分枝杆菌 KatG 基因突变及其与异烟肼耐药相关性[J]. 中国人兽共患病学报,2011,27(3):233-237.

[14] 马峻,陈高瞻,董洁莉,等. 武汉地区耐异烟肼结核分枝杆菌临床分离株 KatG 基因突变的分子特征分析[J]. 中国防痨杂志,2014,37(1):95-97.