

网络出版时间: 2019-1-11 14:07 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.035.html>

耐药结核分枝杆菌与耐药基因突变的相关性分析

孔伟伟¹, 邢应如², 胡万发², 胡东³, 吴璇¹, 于莉¹, 汪旻旻¹, 黄升海¹

摘要 探讨结核患者结核分枝杆菌(MTB)耐药性与基因突变情况。68例临床分离菌株采用罗氏药敏实验检测 MTB 对利福平(RFP)、异烟肼(INH)、链霉素(SM)、吡嗪酰胺(PZA)和乙胺丁醇(EMB)的耐药情况,采用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)检测 MTB 临床分离株耐利福平(rpoB)、异烟肼(katG)、链霉素(rpsL)、吡嗪酰胺(pncA)、乙胺丁醇(embB)基因突变率,5种耐药基因突变率依次为78.2%、69.8%、72.2%、43.8%、31.4%,其中高耐药基因突变率分别为92.1%、80.0%、87.5%、72.0%、45.5%。低耐药株分别为47.1%、25.0%、28.5%、13.0%、7.7%。MTB 耐药基因突变与耐药水平密切相关,PCR-SSCP法检测结核分枝杆菌 rpoB、katG、rpsL、pncA 和 embB 基因突变快速、敏感、特异。

关键词 结核分枝杆菌;药敏实验;聚合酶链反应-单链构象多态性

中图分类号 R 378.91+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)02-0329-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.035

在医学迅速发展的今天,全球仍有约1/3人口受过结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染,且每年都有新增病例,相关研究^[1]显示,我国是全球22个结核病高负担国家之一。传统的MTB培养耗时长,实验本身也存在一些问题,已经不能满足临床诊治的需要^[2]。随着分子生物学的发展,MTB耐药分子机制被进一步阐明。研究^[3]表明,MTB耐药的主要机制是基因突变,结核分枝杆菌 rpoB、katG、rpsL、pncA 和 embB 基因突变可能分别与 MTB 耐利福平(rifampin, RFP)、异烟肼(isoniazid, INH)、链霉素(streptomycin, SM)、吡嗪酰胺

(pyrazinamide, PZA)和乙胺丁醇(ethambutol, EMB)密切相关。为了获得 MTB 耐药性特征,该实验用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)检测 MTB 临床分离株的 rpoB、katG、rpsL、pncA 和 embB 基因突变,并和常规药敏实验(drug sensitive test, DST)做对照,进一步探讨 MTB 耐药性与耐药基因之间的关系,为临床用药提供更多的指导。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集安徽医科大学第一附属医院和安徽理工大学附属肿瘤医院共68例临床耐药株肺结核患者痰标本,结核分枝杆菌 H₃₇Rv ATCC27294 为 MTB 药物敏感试验质控菌株, H₃₇Rv ATCC35822 为异烟肼耐药质控菌株, H₃₇Rv ATCC35838 为利福平耐药质控菌株, H₃₇Rv ATCC35820 为链霉素耐药质控菌株, H₃₇Rv ATCC35828 为吡嗪酰胺耐药质控菌株, H₃₇Rv ATCC35837 为乙胺丁醇耐药质控菌株,均由卫生部生物制品鉴定所提供。

1.2 MTB 鉴定和药敏 罗氏培养基购自珠海贝索生物技术有限公司(批号:20161128),培养基内不同药物浓度含量如下:RFP 高浓度250 mg/L,低浓度25 mg/L;INH 高浓度10 mg/L,低浓度1 mg/L;链霉素 SM 高浓度100 mg/L,低浓度10 mg/L;PZA 高浓度250 mg/L,低浓度50 mg/L;EMB 高浓度50 mg/L,低浓度5 mg/L。MTB 基因鉴定与耐药基因检测试剂盒(批号 T201709001)购自深圳亚能生物基因研究所。

1.3 PCR-SSCP 检测方法 患者痰标本经 NaOH 液化、离心等前处理后,经 Bactec-960 仪快速培养后,培养阳性标本经涂片染色确定为抗酸分枝杆菌并做罗氏药敏实验,耐药性测定方法和耐药标准判断按照“全国结核病细菌学检验标准化规程”进行。挑取耐药 MTB 菌株培养物,提取 DNA, -20℃ 保存备用。PCR 扩增:在 25 μl 反应体系中 4×dNTP 的终浓度为 0.2 μmol/L,引物 I、II 的终浓度分别为 0.3 μmol/L,纯化的 DNA 模板 5~25 ng, TaqDNA 聚合酶 1 U,在 DNA 热循环仪中,按 94℃ 变性 50 s, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min,扩增 35 个循环,最

2018-10-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371797、81571528);淮南市科技计划项目(编号:2015A2401、2017A0592)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院微生物学教研室,合肥 230032

²安徽理工大学附属肿瘤医院,淮南 232035

³安徽理工大学,淮南 232001

作者简介:孔伟伟,女,副主任技师,硕士研究生;

黄升海,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: huang-shh68@aliyun.com

后在 72 ℃ 延伸 7 min, 取 3 μl 扩增产物在 2 % 琼脂糖凝胶中电泳检测扩增产物, 可分别扩增 MTB 耐利福平基因 (rpoB) 产生 232 bp 片段; 耐异烟肼基因 (katG) 产生 273 bp 片段; 耐链霉素基因 (rpsL) 产生 267 bp 片段; 耐吡嗪酰胺基因 (pncA) 上游产生 282 bp 片段, 下游产生 248 bp 片段; 耐乙胺丁醇基因 (embB) 产生 365 bp 片段。耐药基因完全缺失, PCR 扩增为阴性。将临床分离株与 MTB 标准株的 DNA-PCR 扩增产物加在同一块 8 % (29 : 1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶中, 4 ℃、100 ~ 120 V 电泳 6 h, 取凝胶板行硝酸银染色, 观察记录结果。

1.4 结果判定 耐药 MTB 菌株 DNA PCR 扩增产物与 RFP、INH、SM、PZA、EMB 敏感标准菌株和耐药质控菌株相关的 DNA 扩增产物比较, 标本出现与耐药质控菌株相同泳动条带, 则判定存在检测基因突变。

1.5 统计学处理 计数资料耐药株以 *N* 表示, 耐药率以 (%) 表示, 组间差异采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 罗氏药敏实验结果 结果见表 1。

表 1 MTB 药物敏感实验结果

抗菌药物	高浓度		低浓度		合计	
	耐药株 (<i>N</i>)	耐药率 (%)	耐药株 (<i>N</i>)	耐药率 (%)	耐药株 (<i>N</i>)	耐药率 (%)
利福平	38	69.1*	17	30.9	55	80.9
异烟肼	35	81.4*	8	18.6	43	63.2
链霉素	39	72.2*	15	27.8	54	79.4
吡嗪酰胺	25	52.1	23	47.9	48	70.6
乙胺丁醇	22	62.3*	13	37.1	35	50.0

与低浓度耐药株耐药率比较: * $P < 0.05$

2.2 PCR 实验结果

2.2.1 PCR 扩增的特异性 用 PCR 法对 68 例临床 MTB 菌株及 H₃₇Rv ATCC27294 敏感质控菌株进行结核 DNA 特异性扩增, 经 2 % 琼脂糖电泳, 均扩增出相应产物, 其中利福平和链霉素耐药基因 PCR 扩增产物结果模式见图 1、2。

2.2.2 PCR-SSCP 分析 经解链后, RFP、INH、SM、PZA 和 EMB 敏感株与其参考株 H₃₇Rv 的单链 DNA 在琼脂糖凝胶电泳中迁移率相同, 而耐药株中则存在不同数量的泳动变位, 基因 SSCP 图谱与 H₃₇Rv 标准株相同者判定为药物敏感株, SSCP 图谱与标准株泳动有差异者, 考虑存在耐药基因突变, 其中利福平 rpoB 耐药基因和链霉素 rpsL 耐药基因的 PCR-SSCP 检测结果模式见图 3、4。55 例耐利福平分离

株中 rpoB 基因总突变率为 78.2 % (43/55); 43 例耐异烟肼分离株中, katG 基因总突变率为 69.8 % (30/43); 54 例耐链霉素分离株中, rpsL 基因总突变率为 72.2 % (39/54); 48 例耐吡嗪酰胺分离株中, pncA 基因总突变率为 43.8 % (21/48); 35 例耐乙胺丁醇分离株中, embB 基因总突变率为 31.4 % (11/35)。高浓度耐药基因突变率显著高于低浓度耐药株突变率 ($P < 0.01$), 具体突变率情况见表 2。

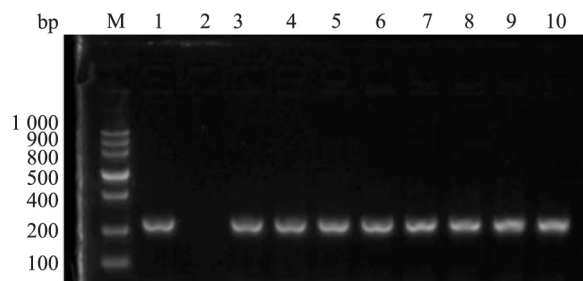


图 1 利福平耐药基因 PCR 扩增产物

M: DNA Marker; 1: H₃₇Rv ATCC27294; 2: 阴性对照; 3 ~ 9: 样本; 10: 阳性对照

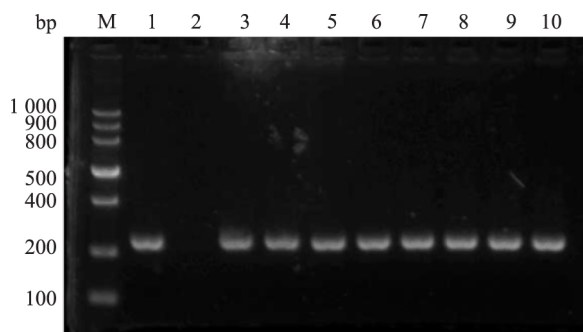


图 2 链霉素耐药基因 PCR 扩增产物

M: DNA Marker; 1: H₃₇Rv ATCC27294; 2: 阴性对照; 3 ~ 9: 样本; 10: 阳性对照

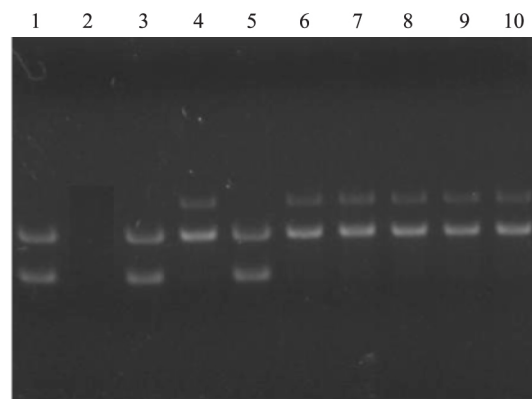


图 3 rpoB 基因 SSCP 分析部分结果

1: H₃₇Rv ATCC27294 阴性对照; 2: 空白对照; 4, 6, 7, 8, 9: 突变株; 3, 5: 敏感株; 10: H₃₇Rv ATCC35838 阳性对照

表2 结核分枝杆菌耐药基因检测结果

耐药基因	高浓度		低浓度		合计	
	突变株/耐药株(n/N)	突变率(%)	突变株/耐药株(n/N)	突变率(%)	突变株/耐药株(n/N)	突变率(%)
rpoB	35/38	92.1**	8/17	47.1	43/55	78.2
katG	28/35	80.0**	2/8	25.0	30/43	69.8
rpsL	35/39	87.5**	4/15	28.5	39/54	72.2
pncA	18/25	72.0**	3/23	13.0	21/48	43.8
embB	10/22	45.5**	1/13	7.7	11/35	31.4

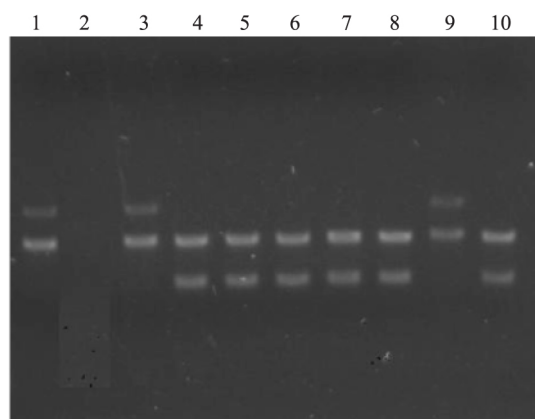
与低浓度耐药株耐药率比较: ** $P < 0.01$ 

图4 rpsL 基因 SSCP 分析部分结果

1: H₃₇Rv ATCC27294 阴性对照; 2: 空白对照; 4~8: 突变株; 3、9: 敏感株; 10: H₃₇Rv ATCC35820 阳性对照

3 讨论

近年来, MTB 耐药率不断攀升, 耐药结核病已成为全球结核病防控工作面临的严峻挑战^[4]。MTB 基因组中很少见到通过质粒或可移动遗传元件从外界获得遗传物质的水平基因转移事件, 因此耐药相关基因突变是其主要耐药分子机制^[5]。MTB 耐药性的出现是基因突变的一种表达方式, 不同药物的耐药突变株出现的突变频率各不相同, 耐药程度不同, 可通过检测 MTB 耐药基因突变来预测表型耐药。

本研究采用 PCR-SSCP 方法对 68 例临床耐药 MTB 菌株进行 5 种耐药基因的检测, MTB 对 RFP 产生耐药主要因其编码 RNA 聚合 β 亚单位的 rpoB 基因突变后, RFP 与 RNA 聚合酶的结合能力减弱, 从而导致对 RFP 耐药^[6]。本实验 55 例耐 RFP 标本中有 3 例高耐株和 9 例低耐株未检出突变, 可能是细胞壁渗透作用下降引起的, 高耐株突变占总突变的 63.6%, 低耐株占 14.6%, 耐药基因检测结果提示, 高浓度耐药的 MTB 基因突变率高于低浓度的突变率, 表明 MTB 耐药程度与耐药基因突变之间存在着

较为密切的关系。研究^[7]表明 katG 基因的完全缺失不是 INH 耐药性的主要原因, katG 基因突变才是引起 INH 耐药性的更为重要原因。实验结果中 69.8% MTB 耐 INH 分离株有 katG 基因突变, 与戚应杰等^[8]的研究相近。其中高耐株突变率 80%, 更证实其与 INH 耐药密切相关。研究^[9]显示, MTB 的 rpsL 基因突变与 SM 耐药有关。本实验结果显示耐 INH 基因突变率 72.2%, 与以往报道^[10] 50% ~ 85.2% 相符, 说明 rpsL 基因突变是 MTB 耐 SM 的主要原因。近年来研究^[11]表明 MTB 耐 PZA 是由于 PZA 酶编码基因(pncA)突变, 使 PZA 酶活性丧失或降低所致。实验的 48 例临床耐 PZA 标本中有 18 例高耐株发生基因突变, 低耐株有 3 例发生基因突变, 高浓度耐药菌的基因突变率高于低浓度突变率, pncA 上游和 pncA 下游基因总突变率为 43.8%, 说明其基因突变范围广泛。研究^[12]表明 MTB 耐 EMB 与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 embABC 操纵子突变或 Emb 蛋白表达增高有关。本实验耐 EMB 总突变率为 31.4%, 低于其他几种基因, 可能是 EMB 基因比其他 4 种耐药基因更稳定, 或者是该药较其他 4 种药物使用频率更低, 具体机制尚需进一步研究。

耐药基因检测结果显示高浓度耐药的 MTB 耐药基因突变率高于低浓度耐药基因突变率, 说明 MTB 耐药程度与耐药基因突变之间存在着一定的相关性, 高浓度耐药的 MTB 与耐药基因突变相关度较高, 说明 rpoB、katG、rpsL、pncA、embB 基因的突变是 RFP、INH、SM、PZA、EMB 对 MTB 耐药的重要分子机制。RFP 总突变率最高, 其次是 SM、INH、PZA、EMB 总突变率相对较低。本研究耐药基因检测结果与药敏结果并非完全对应, 部分药敏实验耐药菌未能检出耐药基因突变, 这种差别的存在说明上述耐药基因突变可能只是 MTB 的部分耐药机制, 还存在未能检测到的耐药机制, 这表明了 MTB 耐药机制的复杂性和多样性, 提示需要做进一步研究。分子流行病学研究^[13]表明, 耐药 MTB 造成的传播事件

甚至比敏感菌株更多,一个重要原因是耐药结核病患者治疗周期长或久治不愈,导致传播时间更长、传播范围更广。因此,早期、快速地检出突变菌株能为临床治疗提供有效依据,将对结核病防治起到重要作用。

参考文献

- [1] 席向宇,戴明佳,颜学兵. 徐州地区 2695 例涂阳肺结核患者结核分枝杆菌耐药状况分析[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2015, 9(3): 347-51.
- [2] 孙炳奇,张娟,孙娇等. 基因芯片技术检测结核杆菌耐药的临床研究[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(3): 434-6.
- [3] 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): 2100-7.
- [4] Ahmed M M, Velayati A A, Mohammed S H. Epidemiology of multidrug-resistant, extensively drug resistant and totally drug resistant tuberculosis in middle east countries [J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5(3): 249-56.
- [5] Gygli S M, Borrell S, Trauner A, et al. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanistic and evolutionary perspectives[J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(3): 354-73.
- [6] Andre E, Goeminne L, Cabibbe A, et al. Consensus numbering system for the rifampicin resistance-associated rpoB gene mutations in pathogenic mycobacteria [J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(3): 167-72.
- [7] 王吉,崔振玲,景凤香等. 结核分枝杆菌异烟肼耐药基因突变微通道电泳检测方法的建立[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(12): 785-89.
- [8] 戚应杰,查晓丹. 耐多药结核分枝杆菌基因位点表达研究[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(24): 4118-21.
- [9] 孙荣,欧维正,王燕等. 贵阳市结核分枝杆菌链霉素和乙胺丁醇耐药相关基因突变的检测与分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(8): 760-4.
- [10] Shi R, Zhang J, Li C, et al. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing [J]. Microbes Infect, 2007, 9(14-15): 1538-44.
- [11] 李洪敏,吴雪琼,王巍等. 分析 5 种结核杆菌耐药基因突变与耐药水平的关系[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(6): 644-6.
- [12] Lacoma A, Molina-Moya B, Pracht C, et al. Pyrosequencing for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* second-line drugs and ethambutol resistance [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 83(3): 263-9.
- [13] Shah N S, Auld S C, Brust J C, et al. Transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa [J]. N Engl J Med, 2017, 376(3): 243-53.

Correlation analysis between drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and drug-resistant gene mutation

Kong Weiwei¹, Xing Yingru², Hu Wanfa², et al

(¹Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Affiliated Tumour Hospital of Anhui University of Science and Technology, Huainan 232035)

Abstract To understand the drug resistance and gene mutation of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in patients with pulmonary tuberculosis. The resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin (RFP), isoniazid (INH), streptomycin (SM), pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB) was detected by Roche susceptibility test in 68 clinical isolates. The polymerase chain reaction single strand conformation multistate analysis (PCR-SSCP) was used to detect tuberculosis branching. Bacterial rpoB, katG, rpsL, pncA and embB gene mutations. The mutation rates of rifampin resistant (rpoB), isoniazid (katG), streptomycin (rpsL), azinamine (pncA) and ethambutol (embB) were 78.2%, 69.8%, 72.2%, 43.8% and 31.4%, respectively. The mutation rates of high resistant strains were 92.1%, 80.0%, 87.5%, 72.0% and 45.5%, respectively. The low resistant plants were 47.1%, 25.0%, 28.5%, 13.0% and 7.7%, respectively. The mutation of drug-resistant gene of *Mycobacterium tuberculosis* is closely related to the level of drug resistance. The PCR-SSCP method is rapid, sensitive and specific for detecting rpoB, katG, rpsL, pncA and embB mutations in *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; drug sensitivity test; polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism