

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.12.009

文章编号: 1005-8982 (2018) 12-0053-05

新进展研究·论著

西安市耐异烟肼的结核杆菌耐药性及分子特征分析*

周爱萍¹, 张敏¹, 李文侠², 张增贤³, 沙莎¹, 董鸿智¹, 胡群英¹

(1. 西藏民族大学医学院高原环境与疾病相关基因研究高校重点实验室, 陕西 咸阳 712082; 2. 陕西省咸阳市肺科医院 检验科, 陕西 咸阳 712046; 3. 陕西省西安市胸科医院 检验科, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的 了解西安市临床分离的结核分枝杆菌异烟肼耐药菌株 katG315、inhA-15 突变情况及其分子特征。**方法** 利用 BACTAC MGIT960 分枝杆菌快速培养系统对临床分离结核分枝杆菌进行药敏试验, 采用定向缺失多重 PCR (DTM-PCR) 对异烟肼耐药菌株进行基因分型研究, 分别利用多重等位基因特异 PCR (MAS-PCR) 和 PCR-DNA 测序法对其 katG315 和 inhA-15 突变热点进行检测。**结果** 117 株异烟肼耐药菌株有 73 株为多重耐药结核分枝杆菌 (62.39%), 104 株为北京型菌株 (88.89%), 81 株存在 katG315 位点突变 (69.23%), 10 株存在 inhA-15 位点突变 (8.55%)。**结论** 西安市异烟肼耐药分枝杆菌以北京型菌株为主, 耐药表型主要表现为多重耐药, 主要突变为 katG315 突变。

关键词: 结核分枝杆菌; 异烟肼; 耐药; 基因分型

中图分类号: R521

文献标识码: A

Drug resistance analysis and molecular characterization of Isoniazid resistant mycobacterium tuberculosis in Xi'an*

Ai-ping Zhou¹, Min Zhang¹, Wen-xia Li², Zeng-xian Zhang³,
Sha Sha¹, Hong-zhi Dong¹, Qun-ying Hu¹

(1. School of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang, Shanxi 712082, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Xianyang Pulmonary Hospital, Xianyang, Shanxi 712046, China; 3. Department of Laboratory Medicine, Xi'an Chest Hospital, Xi'an, Shanxi 710061, China)

Abstract: Objective To investigate the drug resistance of Isoniazid (INH)-resistant mycobacterium tuberculosis (MTB) in Xi'an and molecular characteristics. **Methods** Totally 117 INH-resistant MTB were isolated and subjected to molecular characterization of hotspot mutations within katG315 and inhA-15 by MAS-PCR (Multiplex allele-specific PCR) and direct sequencing. The isolates were genotyped by DTM-PCR (Deletion-targeted multiplex PCR). **Results** Among 117 isolated colonies, 73 were MDR-MTB (62.39%). Hotspot mutations analysis demonstrated that 81 (69.23%) isolates had mutation in the katG315 and 10 (8.55%) isolates had mutation in inhA-15 promotor region. DTM-PCR indicated that 104 isolates (88.9%) were Beijing genotype. **Conclusion** Beijing genotype accounts for the majority of INH-resistant isolates in Xi'an. Multidrug resistance of MTB in Xi'an is prevailing, and more than 70% INH-resistant isolates harbor mutation in katG315.

Keywords: mycobacterium tuberculosis, isoniazid, drug resistant, genotyping

收稿日期: 2017-04-21

*基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81560668); 西藏民族大学青年学人培育计划 (No: 15MYQP06); 西藏高校青年教师创新支持计划项目 (No: QCZ2016-36); 西藏自治区科技厅重点项目 (No: 2015XZ01G17); 西藏文化传承发展协同创新中心课题 (No: XT-ZB201609)
[通信作者] 胡群英, E-mail: zhangmin-wen@163.com

结核病发病率在全球范围内一直居高不下,我国是全球 22 个结核病高负担国家之一,发病率居世界第 2 位。异烟肼作为消灭结核分枝杆菌作用最强的全杀菌药物,自 1952 年首次用于结核病的临床治疗以来一直是抗结核治疗的首选药物。近年来,结核分枝杆菌对异烟肼耐药情况日益严重,给结核病的防治工作带来巨大挑战。2012 年一项研究中,中国结核分枝杆菌异烟肼耐药率为 20.9%^[1],高于全球水平 11.5%。异烟肼耐药是结核菌多重耐药的基础,对异烟肼耐药菌株的分子特征与其传播之间的关系研究非常有意义。结核菌耐药性的产生主要是由染色体 DNA 发生突变引起。目前已发现结核分枝杆菌耐异烟肼的相关基因有 katG、inhA、aphC、oxyR、mabA、kasA 等基因,其中以 katG 和 inhA 基因的突变关系最为密切^[2-3]。95% 的异烟肼耐药与 katG 基因突变有关^[4],其中最常见是 KatG S315T 突变,不同地区的异烟肼耐药临床菌株发生突变的相关基因及突变频率有差异^[5]。

本研究拟对临床分离结核分枝杆菌进行药敏试验并采用定向缺失多重 PCR(deletion-targeted multiplex PCR, DTM-PCR)方法对异烟肼耐药菌株进行的基因分型研究,分别利用多重等位基因特异 PCR(multiplex allele-specific PCR, MAS-PCR)和 PCR-DNA 测序方法对其 katG315 和 inhA-15 突变热点进行检测。了解西安市异烟肼耐药临床分离菌株的分子特征。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 2011 年 1 月-2011 年 12 月西安结核病院住院患者的痰液标本 117 株,且确诊为结核分枝杆菌异烟肼耐药临床菌株。经 BACTAC MGIT960 分枝杆菌快速培养系统培养并经过菌种鉴定。标准菌株 H37Rv 由国家参比实验室提供作为对照株。2×Taq PCR Master Mix、Taq 酶(购自北京天根生化科技有限公司),三磷酸脱氧核苷(购自美国 Sigma 公司),DNA ladder(购自加拿大 MBI Fermentas 公司),引物合成由生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 药敏试验 按照全自动快速分枝杆菌培养系统说明书进行操作,分别在 MGIT960 培养管中加入链霉素、异烟肼、利福平和乙胺丁醇,使其终浓度分别为 1.0、0.1、1.0 及 5.0 μg/ml。

1.2.2 分枝杆菌基因组 DNA 提取 收集经 BACTAC

MGIT 960 分枝杆菌快速培养系统培养及鉴定的异烟肼耐药结核分枝杆菌临床菌株,首先对培养管 80℃ 水浴 3 h 灭活以消除管中结核分枝杆菌的传染性。收集的菌体用水煮法提取结核分枝杆菌基因组 DNA,具体步骤如下:200 μl TE 缓冲液重悬菌体,100℃ 煮沸 10 min,立即置于冰上 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,上清可直接用于 PCR 扩增。

1.2.3 MAS-PCR 及 PCR-DNA 测序 根据文献[6-7]针对 katG315 和 inhA-15 合成 MAS-PCR 引物(katG-F/katG315-R、inhA-15-F/inhA-15-R)及 PCR-DNA 测序引物(katG-F/katG-R、inhA-F/inhA-R)(见表 1)。为确保 MAS-PCR 结果的准确性,各随机选择 10 株 MAS-PCR 结果不同的菌株扩增目的片段并进行测序。katG315 位点 MAS-PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 45 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,根据目的片段的有无,判断检测是否存在突变。PCR-DNA 测序反应条件为:94℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 45 s,58℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。目的片段 PCR 扩增产物经电泳检测后,送上海美吉生物技术有限公司进行序列测定,并将测序结果与 GeneBank 进行比对。

1.2.4 DTM-PCR 基因分型 根据文献[6]合成 3 条用于 DTM-PCR 基因分型的引物(Beijing-P1, Beijing-P2, Beijing-P3)。H37Rv 基因组 DNA 作为非北京型对照,PCR 反应体系及条件参考文献[7]进行。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,根据产物片

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
katG	正向: 5'-GCAGATGGGGCTGATCTACG-3'
	反向: 5'-AACGGGTCCGGATGGTG-3'
katG315	正向: 5'-GCAGATGGGGCTGATCTACG-3'
	反向: 5'-ATACGACCTCGATGCCGC-3'
inhA-15	正向: 5'-CGAAGTGTCTGAGTACACACCG-3'
	反向: 5'-TCACCCCGACAACCTATCG-3'
inhA	正向: 5'-CGTCAATACACCCGCAG-3'
	反向: 5'-CCCGGTGAGGTGGC-3'
Beijing-P1	5'-GGAGTCGTTGAGGGTGTTCATCAGCTCAGTC-3'
Beijing-P2	5'-CGCCAAGGCCGCATAGTACAGGTCG-3'
Beijing-P3	5'-GGTTGCCACTGCTCGATATGCTGGACTT-3'

段大小判断其是否为北京型菌株。

2 结果

2.1 药敏实验结果

117 株异烟肼耐药菌株中, 有 73 株为多重耐药 (62.39%), 其中对 4 种一线抗结核药物全部耐受有 35 株 (29.91%), 耐药结果 (见表 2)。MDR-TB (多重耐药结核菌) 同时耐受异烟肼和利福平的结核菌; PDR-TB (多重耐药结核菌), MDR-TB 以外至少耐受 2 种抗结核药物的结核菌 (R: 利福平; H: 异烟肼; E: 乙胺丁醇; S: 链霉素)。

2.2 katG315 和 inhA-15 位点突变

部分菌株 MAS-PCR 结果 (见图 1)。117 株异烟肼耐药菌株中, 81 株 (69.23%) 存在 katG315 位点突变, 10 株 (8.55%) 存在 inhA-15 位点突变 (其中 3 株检测到双位点突变)。在 73 株 MDR-MTB 菌株中, 有 49 株存在 katG315 突变, 5 株存在 inhA-15 突变。MDR

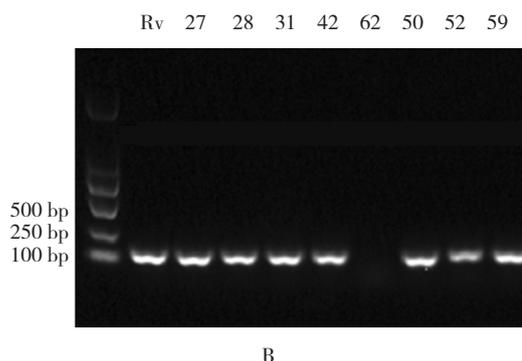
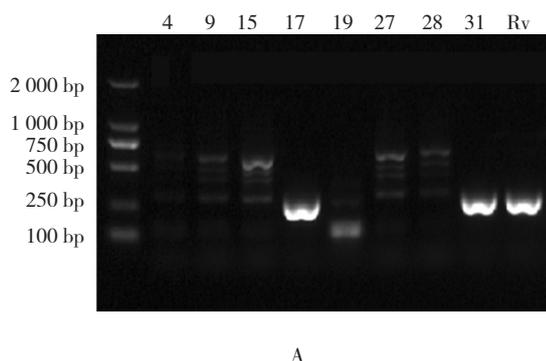
菌株中 katG315 突变菌株所占比例高于野生型菌株 (67.12% vs 32.88%)。inhA-15 突变菌株在 MDR-MTB 中的比例也高于其他耐药菌株 (6.85% vs 4.54%)。

2.3 DTM-PCR 基因分型结果

部分菌株 DTM-PCR 结果 (见图 2)。如其电泳条带为 1 500 bp 判断为非北京基因型菌株, 电泳条带

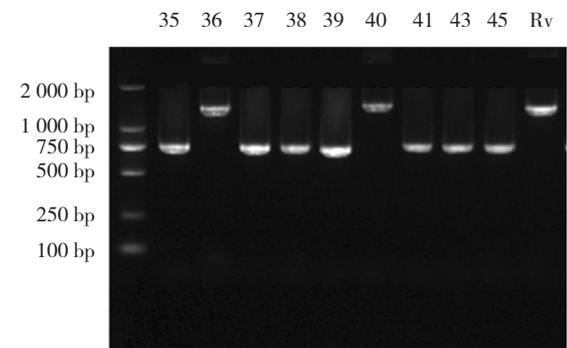
表 2 异烟肼耐药菌株的药敏结果 (n=117)

耐药菌株类型	耐药菌株分布例 (%)
单耐异烟肼	14 (11.97)
MDR-TB	73 (62.39)
异烟肼 + 利福平	15 (12.82)
异烟肼 + 利福平 + 链霉素	19 (16.24)
异烟肼 + 利福平 + 乙胺丁醇	4 (3.42)
异烟肼 + 利福平 + 链霉素 + 乙胺丁醇	35 (29.91)
PDR-TB	30 (25.64)
异烟肼 + 链霉素	23 (19.66)
异烟肼 + 链霉素 + 乙胺丁醇	7 (5.98)



A: 4、9、15、19、27、28 共 6 个样本 PCR 产物无 245 bp 大小目的条带, 表明 katG315 位点有突变; 17、31 样本 PCR 产物有 245 bp 目的条带, 表明 katG315 位点无突变; B: 62 号样本无目的条带, 表明存在 inhA-15 位点的突变; Rv 位标准菌株

图 1 部分结核分枝杆菌 katG315 位点及 inhA-15 位点 MAS-PCR 结果



Rv: H37Rv 非北京型对照; 36、40 共 2 个样本 PCR 产物为 1 466 bp, 是非北京型菌株; 35、37、38、39、41、43 及 45 共 7 个样本的 PCR 产物为 786 bp, 是北京型菌株

图 2 部分结核分枝杆菌 DTM-PCR 结果

为 786 bp 判断为北京基因型菌株。117 株异烟肼耐药菌株有 104 株为北京型 (88.89%), 13 株为非北京型菌株。

3 讨论

作为一个全球公共卫生问题, 结核病目前严重威胁着人类的健康。目前抗结核病一线药物有 4 种 (异烟肼、利福平、链霉素及乙胺丁醇)。当前, 全球结核病耐药形势异常严峻, 多重耐药结核分枝杆菌 (MDR-MTB, 至少同时耐受异烟肼和利福平的结核杆菌) 比例居高不下, 结核菌耐药菌株的产生和播散使结核病的防治困难重重。本研究通过对来自西安市结

核病院的 117 株异烟肼耐药临床菌株耐药性分析,发现目前西安市结核杆菌耐药形势的严峻性,应引起有关部门重视。

异烟肼是 1912 年首次合成的 1 种酰胺类化学药物,其抗菌作用非常强。但近年来结核分枝杆菌 INH 耐药性及耐多药性呈上升趋势。2014 年世界卫生组织报告 INH 耐药情况在新发病例中占 8.1%,在经治病例中占 14.0%。我国 INH 耐药情况更是严重,根据 2010 年我国进行第 5 次全国结核病流行病学抽样调查结果显示,INH 初始耐药率为 28.2%,获得性耐药率为 30.8%^[7]。

结核菌耐药性产生主要是由染色体 DNA 发生突变引起。与异烟肼耐药关系最为密切基因突变位点为 katG315 位点。katG 基因是过氧化氢酶-过氧化物酶的编码基因,315 位点是 katG 与活性密切相关的位点,该位置发生突变可阻碍 katG 活性位点的甲基化,从而影响 INH 与 katG 结合,导致 INH 不能被活化,失去对结核杆菌的杀伤作用。该类型突变在耐受异烟肼结核杆菌中占 50%~90%,并且与高浓度异烟肼耐受相关^[8]。

研究表明,世界各地结核分枝杆菌 katG315 位点突变菌株流行与结核病流行相一致。与结核病低负担地区相比,结核病高负担地区 katG315 位点突变菌株更为流行。在我国不同地区间,该位点突变在异烟肼耐药菌株中所占比例差别较大。2013 年研究发现,合肥地区其比例为 42.6%^[9],2010 年中国东部农村一项研究中,异烟肼耐药菌株中,存在该位点突变的菌株为 61.8%^[10]。本研究 117 株异烟肼耐药菌株中,有 81 株 (69.23%) 存在 katG315 位点突变,与南非报道水平相当 (64%),高于巴塞罗纳 (55%)、新加坡 (26%) 及芬兰 (7%) 等地区,而低于俄罗斯西北部地区 (93%)。西安地区异烟肼耐药临床菌株以 katG315 突变为主,提示该地区结核病疫情严重。

活化 INH 作用于细菌胞壁脂肪酸合成的靶位有多个,inhA 蛋白是公认的原始靶位。有文献报道该基因及其启动子区域突变在异烟肼耐受的结核菌株中占 21%~24%,并且 inhA-15 位置突变比 inhA 编码基因突变更为常见^[11]。当 inhA-15 位点发生单个碱基置换后,其启动子活性增强,使 inhA 基因过度表达,从而削弱 INH 杀菌效能。该位点发生突变的菌株通常与低浓度耐药相关。本研究中 117 株异烟肼耐药菌株中,有 10 株存在 inhA-15 位点突变,低于有关文献报道的比例。

流行病学的研究方法能预测疾病暴发流行及其传播模式。以结核分枝杆菌基因型分型技术为基础的分子流行病学可研究结核菌株之间的遗传学关系,有助于探讨多种重要的流行病学问题。北京基因型菌株是结核分枝杆菌地域分布最为广泛的菌株,大约占世界各地菌株 13%,东亚 50%。也是中国临床 MTB 的优势菌株。有研究表明,北京型菌株与耐药性有一定相关性^[12],并具有更强的毒力和传播性^[13]。间隔区寡核苷酸分型法是鉴定北京基因型菌株的金标准,但该方法操作复杂、成本较高。本研究采用 DTM-PCR 法是高谦等人根据北京基因型菌株的特异分子标志 RD105 缺失区建立起来一种多重 PCR 反应,利用 3 条引物通过对 RD105 区检测,简单快速地鉴定北京型菌株^[6]。本研究对 117 株异烟肼耐药临床菌株进行 DTM-PCR 分型,发现 104 株为北京型菌株。与中国其他地区一样,北京型菌株是目前西安市流行的优势菌株。

综上所述,发现北京型菌株是西安市异烟肼耐药临床菌株的主要基因型,其药敏特性以 MDR 为主,引起耐药的主要突变为 katG315 位点突变。鉴于目前西安市结核杆菌耐药形势的严峻性,强烈建议充分调动各方面力量,加大结核病防治工作力度,重视耐药菌株监测,加强用药合理性和全程性,及时遏制耐药菌株的流行和传播。

参 考 文 献:

- [1] ZHAO Y, XU S, WANG L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23): 2161-2170.
- [2] ZHANG Y, HEYM B, ALLEN B, et al. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis[J]. Nature, 1992, 358(6387): 591-593.
- [3] BANERJEE A, DUBNAU E, QUEMARD A, et al. inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in mycobacterium tuberculosis[J]. Science, 1994, 263(5144): 227-230.
- [4] HERRERA-LEON L, MOLINA T, SAIZ P, et al. New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(1): 144-147.
- [5] LEUNG E T, HO P L, YUEN K Y, et al. Molecular characterization of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis: identification of a novel mutation in inhA[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(3): 1075-1078.
- [6] CHEN J, TSOLAKI A G, SHEN X, et al. Deletion-targeted multiplex PCR (DTM-PCR) for identification of Beijing/W genotypes of mycobacterium tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2007, 87(5): 446-449.
- [7] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学

- 学抽样调查报告 [J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.
- [8] ZHANG M, YUE J, YANG Y P, et al. Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(11): 5477-5482.
- [9] 张文艳, 张洁莹, 柯文鸿, 等. 合肥地区异烟肼耐药结核分枝杆菌 KatG 基因突变的分子特征 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(6): 1102-1104.
- [10] HU Y, HOFFNER S, JIANG W, et al. Extensive transmission of isoniazid resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two rural counties of eastern China: A molecular epidemiological study[J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10(1): 43-47.
- [11] MUSSER J M, KAPUR V, WILLIAMS D L, et al. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance[J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(1): 196-202.
- [12] 雷飏, 刘爱平, 侯僖硕, 等. 多重耐药结核临床分离株耐药性和北京基因型相关性分析 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(3): 528-530.
- [13] WANG W, HU Y, MATHEMA B, et al. Recent transmission of W-Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* in rural eastern China[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2012, 16(3): 306-311.

(唐勇 编辑)