

结核分枝杆菌临床株4种耐药基因的检测与分析*

李洪敏 吴雪琼 梁建琴 肖 漓 张树新 韩慧新

(解放军三〇九医院结核中心临床实验室 北京 100091)

摘要: 结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. t*) 4种耐药基因的研究, 了解耐药基因突变情况和耐药水平的关系。108例临床痰标本临床分离株均做传统梯度药敏试验和聚合酶链反应多态-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 试验。结果表明耐 SM (*rpsL*) REP (*rpoB*) INH (*katG*) EMB (*embB*) 基因突变率分别为 78.5%, 68.2%, 70.5%, 48.6%。其中, 上述高耐药株基因突变率分别为 86.5%, 89.3%, 84.3%, 35.3%。低耐药株分别为 28.5%, 16.5%, 7.1%。EMB 在低耐药区无基因突变。*M. t* 的 4 种耐药基因联合检测的分析, 在国内外很少报道。部分 *M. t* 的耐药由耐药基因突变所致, *M. t* 耐药基因突变与耐药水平密切相关, 且 *M. t* 基因突变绝大多数发生在高耐药区中, 也有少部分在低耐区株中发生。
关键词: *M. t* 药敏试验, 聚合酶链反应多态-单链构象多态性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2002) 02-0039-04

THE RESEARCH OF FOUR DRUG RESISTANCE GENE IN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

LI Hong-Min WU Xue-Quong LIANG Jian-Qin XIAO Li ZHANG Shu-Xin HAN Hui-Xin

(*Tuberculosis clinical Lab, The 309th hospital of PLA, Beijing 100091*)

Abstract: objective To study the relationship between drug-resistance gene mutation and drug-resistance level in *M. tuberculosis*. Methods 108 *M. tuberculosis* clinical isolated strains from sputum specimens were analyzed by PCR-SSCP and traditional drug susceptibility tests. Results the gene mutation rate of SM, RFP, INH and EMB resistance clinical isolated strains was 78.5%, 68.2%, 70.5% and 48.6% respectively, and the mutation rate of SM, RFP, INH and EMB high concentration resistance isolated strains was 86.5%, 89%, 84% and 48.6% respectively, but 28.5%, 16.6% and 7.1% was the mutation rate of low concentration resistance strains. Conclusion The gene mutation was in relation with drug resistance level of *M. tuberculosis*. The gene mutation rate was higher in high concentration resistance isolated strains than in low concentration resistance isolated strains.

Keywords: *M. tuberculosis* drug-resistance, PCR-SSCP

本文通过 PCR-SSCP 技术, 建立 *M. t* 菌 4 种耐药基因的检测方法, 分析 108 例临床耐药株的基因突变情况, 探讨 *M. t* 耐药基因突变是否与临床药物的耐受性有联系。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

108 例临床耐药株源于我院住院患者痰标本, 经 Bactec-960 培养和 7H9 培养基梯度药敏试验。链霉素 (SM)、利福平 (RFP)、异菸肼 (INH)、乙胺丁醇 (EMB) 高浓度药物含量分别依次为 4.0mg/L, 400mg/L, 2.0mg/L, 50mg/L。低浓度药物含量分别依

* 全军杰出中青年人才基金资助项目 (No. 01 Z 020)

收稿日期: 2001-04-06, 修回日期: 2001-09-17

次为 0.4mg/L, 40mg/L, 0.2mg/L, 5mg/L。同时按“结核病诊断细菌学检验规程”进行菌种鉴定。

1.2 试剂

M. t 耐药基因检测试剂由本院结核病分子生物实验室提供, 7H9 培养基由美国 BD 公司提供。

1.3 方法

将痰液标本前处理后, 一部分进行梯度药敏试验。另一部分进行 Bacter-960 培养后, 提取 DNA, 至-20℃保存备用。

PCR 扩增: 按试剂说明书进行操作, 扩增 M. t 菌耐 SM 基因 (*rps1*) 产生 267 片段; 耐 RFP 基因 (*rpoB*) 产生 232bp 片段, 耐 INH 基因 (*katG*) 产生 273bp 片段, 耐 ENM 基因 (*embB*) 产生 365bp 片段。

SSCP 分析: 将临床分离株与 M. t 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, 于 4℃100V ~ 120V 电泳 6h, 银染色后并照相。

结果判定: 双链 PCR 产物经变性后形成两条单链, 经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后呈现两条单链带。若所呈现的单链位置与野生型不同, 称为泳动变位, 即可判定存在基因突变。

2 结果

2.1 传统药敏试验

108 例临床标本中, 耐 SM 有 98 株, 其中高耐药株 73 株, 低耐药株有 14 株; 10 株为 SM 敏感株; 耐 INH 有 78 株, 其中高浓度耐 INH 有 64 株, 低浓度耐 INH 有 12 株, 有 30 株为 INH 敏感株, 耐 ENM 有 56 株, 其中高耐有 35 株, 低耐有 21 株, 有 52 株为敏感株。108 例中耐 RFP 有 89 株, 高耐 RFP 有 66 株, 低耐 RFP 有 23 株, 另有 19 株为敏感株 (见表 1)。

耐药结核分枝杆菌基因突变结果

耐药基因	高浓度			低浓度		
	耐药株	突变株	突变率 (%)	耐药株	突变株	突变率 (%)
Rps1	73	63	86.5	14	4	28.57
RpoB	66	59	89.3	23	3	13
KatG	64	54	84.3	12	1	8.3
EmbB	35	17	48.6	21	0	0

2.2 PCR-SSCP 分析

在 108 例 M. t 耐 SM、RFP、INH、EMB 株中, *rps1* 基因扩增均产生 267bp 片段, *rpoB* 基因产生 232bp 片段, *KatG* 基因均产生 273bp 片段, *emb* 基因均产生 365bp 片段, 以 TB 标准标 DNA 扩增产物为对照, 98 例耐 SM 分离株中, 73 例是耐 SM 高耐株, 有 63 株 sscp 分析出现泳动变位的 *rps1* 基因突变, 14 例低耐 SM 分离株中, 有 4 株 SSCP 出现泳动变位。89 例耐 RFP 分离株有耐 SM 总突变率为 66 例是耐 RFP 高耐株, 其中 59 株 sscp 分析出现泳动变位, 23 例低耐 RFP 分离株中, 3 株 SSCP 出现泳动变位的 *rpoB* 基因突变, RFP 总突变率为 69.6% (62/89)。56 例耐 EMB 分离株中, 高耐株有 35 例, 17 株 sscp 分析出现泳动变位, 突变率为 48.6, 21 例低耐 EMB 分离株未发生突变, 耐 EMB 总突变率为 30.4% (17/56)。78 例耐 INH 分离株中, 耐 INH 高耐株有 64 例, 54 株 sscp 分

析出现泳动变位,低耐INH的12例中仅有1株出现*KatG*基因突变的泳动变位,耐INH总突变率为70.5% (55/78) (见表1)。

2.3 基因分析

108例临床多耐药株中,在高浓度有38株3种基因同时突变,还有15株为两种基因同时突变;在低浓度均为单纯基因突变,没有两种基因或3种基因同时突变的现象存在。

3 分析

引起耐SM (*rpsL*), REP (*rpoB*), INH (*katG*), EMB (*embB*) 基因突变的机理^[1-4,6]分别为:RFP抗结核作用机制是通过与M.T RNA聚合酶的 β 亚单位的结合,干扰转录的开始和RNA延伸。编码 β 亚单位的基因被命名为*rpoB*。M.T耐RFP的机制理论上有两种可能:一是药物作用靶分子RNA聚合酶 β 亚单位的突变。二是细胞壁渗透性改变导致药物摄入减少。在试验108例耐药临床标本中有7例高耐株和10例低耐株未突变,可能是属于第二种情况,或存在其它耐药机制。高耐耐药株突变占总突变数的89.3%,低耐耐药株占13%。

SM主要作用于M.T的核糖体,诱导遗传密码的错读,抑制mRNA转译的开始,干扰转译过程中的校对,从而抑制蛋白质合成。最近研究认为某些菌株耐SM是由于其核糖体蛋白 S_{12} 编码基因*rpsL*或16srRNA,编码基因*rrs*突变所致,虽然*rrs*突变也会导致部分M.T耐SM,但*rpsL*突变是SM耐药的主要分子机制。传统药物梯度敏感试验证实,耐SM基因突变株绝大多数发生在高耐药菌株占86.5%,有4例在低耐区发生突变,占28.57%,是4种基因低耐药物突变最高的一种。可能因PCR-SSCP实验敏感,低耐区开始出现少量高耐药菌株的基因突变就被检测出来,或M.T菌易引起SM较大范围的基因突变,或有其他原因待今后研究。

异烟肼(INH)是酰胺类化学合成药物,M.T对其高度敏感,但是也易产生耐药。最近研究表明,M.T耐INH可能与过氧化氢酶——过氧化物酶编码基因*katG*和烯酰基还原酶编码基因*inhA*或烷基过氧化氢酶编码基因*ahpC*改变有关,50%~70%的M.T耐INH分离株*katG*有突变,与本研究70.5%相同(见表)。其中,高耐药株有54株,占总突变的84.3%,仅有1株在低耐药株突变。1992年,Zhang等首次从基因水平上对M.T耐INH耐药性进行研究,发现在3株MIC>50 μ g/mL的高浓度耐药株中,有2株完全缺失*katG*基因,认为M.T中*katG*基因的完全缺失导致了过氧化物酶不被表达,从而引起M.T耐药性。而8株高耐药株的*katG*基因突变,更证实与INH耐药性有关。

EMB是1961年发现的一种抗M.T活性的阿拉伯糖类合成药物,作用于靶分子阿拉伯糖转移酶,影响细胞壁分支菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖复合物的形成。最近研究表明,M.T耐EMB与阿拉伯糖转移酶的编码基因*embABC*操纵子突变或*emb*蛋白过度表达有关,该操作子由*embA*, *embB*, *embC3*个基因组成,其中,*embB*基因(尤其是306位密码子)突变是EMB耐药的主要原因。本研究耐EMB总突变率为30.4%,高耐株突变率为48.6%,21例低耐EMB分离株未发生突变,比Sreevatsan^[9]等报道的突变率低,可能是由于*embB*还存在其它部位突变或有其它耐药基因突变所致,或存在其它耐药机制。

综上所述,M.T耐SM总基因突变率最高,主要表现在低浓度耐药株中的突变率高。RFP是在高耐株突变率最高,RFP、EMB、INH较少在低浓度耐药株中发生突变。说明了耐药M.T菌基因突变有其变化的规律,而且与传统药物敏感试验是有密切联系

的。M.T耐SM基因比较活跃，易突变，且突变范围大，提示临床慎用此药。M.T菌耐EMB基因比其他3种耐药基因稳定，只在高浓度耐药株中突变。也提示临床注意在高浓度耐药株中的变化。还有单个多耐药株的两、3种基因同时突变现象，且均发生在高浓度耐药区域，故不同梯度的药物敏感试验，尤其是高浓度耐药可以筛选出大量耐药M.T。若要进一步确诊，可根据上述四种耐药基因技术进行分析，以常规药物敏感试验加基因诊断技术，取长补短，联合指导临床治疗。

参 考 文 献

- [1] 吴雪琼, 张俊仙, 庄玉辉, 等. 中华结核与呼吸杂志, 1998, 21 (9): 569 ~ 571.
- [2] Honore N, Cole S T. Antimicrob, Agents Chemother, 1994, 38: 238 ~ 241.
- [3] Douglass J, Steyn L M. JID, 1993, 167.: 1505 ~ 1507.
- [4] 李洪敏, 吴雪琼, 王 巍, 等. 现代科学仪器杂志, 2000, 2: 61 ~ 63.
- [5] Zhang Y, Henym B, Allen B, et al. Res Miccyobiol, 1993, 144: 133 ~ 143.
- [6] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Lancet, 1993, 341 (3): 647 ~ 649.
- [7] 李洪敏, 吴雪琼, 张俊仙, 等. 微生物学通报, 2000, 27: 202 ~ 204.
- [8] Morris S, Bai G H, Suffys P, et al. JID, 1995, 171: 954 ~ 960.
- [9] Sreevatsan S, Stockbauer K E, Pan X, et al. Agents Chemother. 1997, 41 (8): 1677 ~ 1681.