·临床研究·

某地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药相关基因突变特征分析*

杨 辉[1,2]，张国良[2]，张明霞[2]，陈心春[2]，陈建波[2]，吴爱武[3△]
（1.广州医学院医学检验系 510182；2.广东省深圳市第三人民医院肝病研究所 518112；
3.广州医学院第一附属医院检验科 510120）

摘 要：目的 了解深圳地区结核分枝杆菌临床分离株利福平和异烟肼的耐药相关基因的突变特点。**方法** 60 株结核分枝杆菌临床分离株通过全自动快速分枝杆菌培养鉴定系统（BACTEC-MGIT960）进行鉴定和药敏分析。在这 60 株菌株中，针对包括利福平耐药决定区（RRDR）在内的 rpoB 基因和异烟肼耐药相关位点 katG315、inhA-15、kasA269、kasA312 进行 PCR 扩增，并将扩增产物 T-A 克隆后进行测序。**结果** 在 60 株结核分枝杆菌临床分离株中，检出利福平耐药株 45 株，敏感株 15 株；异烟肼耐药株 41 株，敏感株 19 株；利福平和异烟肼同时耐药的有 14 株。在 45 株利福平耐药株中，rpoB 基因 RRDR 突变发生率为 91.1%（41/45），共检测到 12 种突变形式，主要突变位点在 531、526、516、533，以 Ser531Leu 突变最常见，占 rpoB 发生基因突变株的 51.2%（21/45）。在 41 株异烟肼耐药株中，katG315 位点有 29 株发生突变，包括 28 株 katG315（AGC-ACC）和 1 株 katG315（AGC-AAC）突变，突变发生率为 70.7%（29/41）；inhA-15 位点有 9 株发生突变，均为（C-T）突变，突变发生率为 21.95%（9/41）。kasA 基因未发现常见突变形式。**结论** 深圳地区结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药相关基因突变位点与国内外研究基本一致，但各位点频率有所不同。

关键词：分枝杆菌，结核；药物耐受性；突变
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.006 **文献标识码：**A **文章编号：**1671-8348(2012)34-3591-03

The characterization of gene mutation in rifampin and isoniazid resistant mycobacterium tuberculosis isolated from a city*

Yang Hui[1,2]，*Zhang Guoliang*[2]，*Zhang Mingxia*[2]，*Chen Xinchun*[2]，*Chen Jianbo*[2]，*Wu Aiwu*[3△]
（1. *Department of Laboratory Medicine，Guangzhou Medical College，Guangzhou，Guangdong* 510182，*China*；2. *Liver Disease Research Institute，the Third People's Hospital of Shenzhen，Shenzhen，Guangdong* 518112，*China*；3. *Department of Laboratory Medicine，the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College，Guangzhou，Guangdong* 510120，*China*）

Abstract：Objective To investigate the characterization of gene mutation in Rifampin and Isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis isolated from Shenzhen. **Methods** 60 Mycobacterium tuberculosis clinical strains were identified and their drug resistance in phenotype were tested by BACTEC MGIT960，rpoB，katG315，inhA 15，kasA269 and kasA312 genes were amplified by PCR and the fragments were cloned into T vector and sequenced. **Results** Among the 60 Mycobacteria tuberculosis clinical strains，45 rifampicin resistant strains and 15 rifampicin susceptible strains；41 isoniazid resistant strains and 19 isoniazid susceptible strains；14 multiple drug resistance strains were detected. About 91.1%（41/45）of Mycobacterium tuberculosis isolates in 45 rifampicin drug resistant strains has mutations in rpoB and there were 12 different mutations，gene locus 531、526、516、533 mutation had a higher frequency especially gene locus 531 which had 51.2%（21/41）of mutational rate in 41 strains with rpoB gnen mutation. Point mutations at gene locus katG315 including katG315（AGC-ACC）in 28 isoniazid resistance strains and katG315（AGC AAC）in 1 isoniazid resistance strain，were found in 70.7%（29/41）of isoniazid resistant strains. 21.95%（9/41）of Mycobacterium tuberculosis isoniazid resistant strains had inhA-15（C-T）mutations，no mutation in kasA was found in the study. **Conclusion** Ompared with other studies，the mutational gene site of Mycobacterium tuberculosis isolates with drug esistance of rifampicin and isoniazid in Shenzhen were consistant，but the gene mutation frequency in common gene locus of drug esistance were different.

Key words：mycobacterium tuberculosis；drug tolerance；mutation

结核病是严重危害人们身体健康的重大公共卫生问题，根据世界卫生组织（WHO）报告，全球将近 1/3 的人口曾经或正在感染结核分枝杆菌，每年约 900 万人发展为活动性结核病，近 300 万人会发展成为耐多药结核病，并有 180 万人死于该病。耐多药结核病是指至少同时对两种主要临床一线药物利福平和异烟肼都耐药的结核病[1]。本研究通过基因测序来分析结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 和异烟肼耐药基因 katG、inhA 启动子、kasA 的突变情况，探讨结核分枝杆菌耐药的特点，为建立快速检测结核分枝杆菌药物敏感性的方法提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 结核分枝杆菌 H37Rv 标准株 DNA 由香港大学微生物实验室馈赠。60 株结核分枝杆菌临床分离株来源于 2010 年 8 月至 2011 年 8 月深圳市第三人民医院住院的危重结核患者。

1.2 仪器与试剂 采用全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏系统（BACTEC-MGIT960）、高速离心机、恒温箱、Qiagen 公司的基因提取试剂盒、Axygen 公司的 PCR 产物纯化试剂盒、Takara 公司的 PCR 反应试剂（DRR006B）和 T 载体试剂盒（D101A）。

1.3 方法

1.3.1 检测方法 实验完全按照全国结核病细菌学检验标准化规程进行，标本在 Middlebrook7H9 结核分枝杆菌液体培养基中培养。并用全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏系统进行检测。

1.3.2 细菌 DNA 的制备 吸取 1 mL 培养阳性的 Middlebrook7H9 结核分枝杆菌液体培养基，在 100 ℃恒温箱中温浴

* **基金项目：**国家自然科学基金资助项目（81172732）。 △ **通讯作者**，Tel：13660281744；E-mail：aiwwu66@163.com。

30 min 进行灭活，然后使用 Qiagen 公司的细菌基因提取试剂盒进行核酸抽提，操作按其说明书进行。

1.3.3 目的基因扩增 针对 rpoB 基因的 RRDR、katG315、inhA 启动子区-15 位点和 kasA 基因 269 和 312 位点进行设计引物，引物由深圳凯杰生物公司设计，上海生工公司进行合成，引物设计见表 1。

表 1 目的基因扩增所用的引物序列及长度

引物	序列（5′～3′）	长度（bp）	Tm 值（℃）
rpoB 基因			
上游引物	CCGACGACATCGACCACTT	488	58.4
下游引物	CACGATCTCGTCGCTAACCA		59.4
katG 基因			
上游引物	ATCGTCGGCGGTCACACTT	276	58.1
下游引物	GTCCTTGGCGGTGTATTGCCA		58.6
inhA 启动子			
上游引物	CCGTCATGGTCGAAGTGTG	326	57.2
下游引物	CATTCGACGCCAAACAGC		57.9
kasA 基因			
上游引物	CGGAGGAGCACGCCAAAG	286	62.2
下游引物	TGGCCCAGCGCAGACTTC		61.5

1.3.4 PCR 检测 PCR 反应体积为 50 μL，其中 DNA 2 μL，Ex Taq 酶 2 U，引物各 20 μmol，dNTP 混合液 4 μL，10×Ex Taq 缓冲液 5 μL，其余由蒸馏水补足。扩增条件为：95 ℃变性 10 min；95 ℃ 30 s，58 ℃ 20 s，72 ℃ 20 s 共 30 个循环；72 ℃维持 10 min。采用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。使用 AxyGen 公司的 PCR 产物纯化试剂盒进行核酸纯化，操作按照说明书进行。使用 Takara 公司 T 载体试剂盒，操作按说明书进行，将纯化好的核酸转入 T 载体后转化到感受态细胞，并在 LB 固体培养基上进行蓝白斑筛选培养。挑选 LB 固体培养基上白色单克隆菌落，进行菌落 PCR 验证为阳性克隆后送到华大基因公司进行测序。测序结果与结核分枝杆菌 H37Rv 标准株进行比较分析。

2 结 果

2.1 全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏仪器检测结果 在被检测的 60 株标本中，利福平耐药株 45 株，敏感株 15 株；异烟肼耐药株 41 株，敏感株 19 株；利福平和异烟肼同时耐药的有 14 株。

2.2 PCR 扩增产物电泳结果 见图 1。

2.3 rpoB 基因检测突变的结果 目的基因被扩增的片段为 488 bp，rpoB 包含了 81 bp 的利福平耐药决定区（RRDR）。RRDR 在 60 个菌株中检测结果（表 2），15 株敏感株均未发生突变。45 株利福平耐药株中有 41 株存在 rpoB 突变，即91.1%（41/45）的利福平耐药菌株存在 rpoB 突变。在这 41 株 rpoB 突变株中发生单一突变的菌株有 32 株，多突变位点重合突变的有 8 株，1 株出现 rpoB 基因 510 和 511 位点缺失。其中最易发生突变的位点为 531 位点，突变率为 51.2%（21/41）；其次为 526、516 位点，这 3 个位点共占 rpoB 基因突变的82.9%（34/41），测序结果见图 2。

2.4 katG 基因检测结果 41 株存在 katG 基因突变，其中 24 株为单个点突变，15 株存在联合突变，2 株存在插入序列。在 24 株单点突变中，有 17 株为 katG315（AGC-ACC）突变，1 株为 katG315（AGC-AAC）突变。在 15 个联合突变中有 11 个存在 katG315（AGC-ACC）突变，结果表明在异烟肼耐药株中，katG315 位点突变的发生率为 70.7%（29/41），其余总共 25 种突变形式暂未发现其突变作用。

2.5 inhA 启动子区基因检测结果 9 株结核分枝杆菌存在 inhA 基因启动子-15 位点 C-T 突变，占异烟肼耐药株的 21.95%（9/41），其他还存在 11 种不同突变。

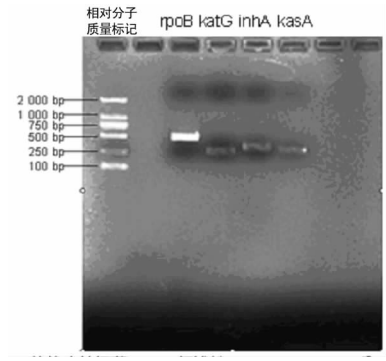
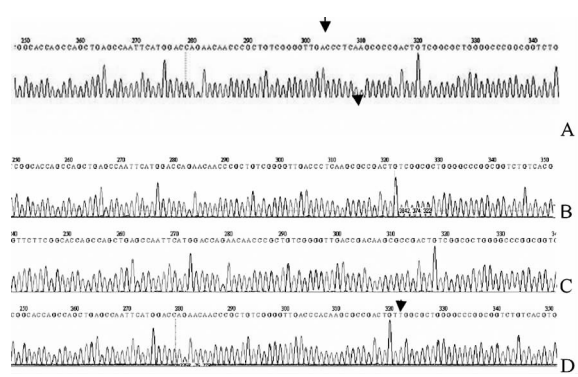


图 1 结核分枝杆菌 H37Rv 标准株 rpoB、katG、inhA 和 kasA 基因扩增结果

表 2 RRDR 基因突变情况

rpoB 基因编码位置*	氨基酸突变	核苷酸突变类型	株数（n）
耐药株			
509	Ser509Arg	AGC-AGG	1
511	Leu511Pro	CTG-CCG	1
516	Asp516Tyr	GAC-TAC	2
	Asp516Val	GAC-GTC	4
526	His526Asp	CAC-GAC	2
	His526Tyr	CAC-TAC	1
	His526Arg	CAC-CGC	1
531	Ser531Leu	TCG-TTG	18
533	Leu533Pro	CTG-CCG	2
509+516	Ser509Arg	AGC-AGG	4
	Asp516Val	GAC-GTC	
514+531	Phe514Cys	TTC-TGC	1
	Ser531Leu	TCG-TTG	
526+533	His526Gln	CAC-CAG	1
	Leu533Pro	CTG-CCG	
527+531	Lys527Glu	AAG-GAG	1
	Ser531Leu	TCG-TTG	
526+527+531	His526Gln	CAC-CAG	1
	Lys527Glu	AAG-GAG	
	Ser531Leu	TCG-TTG	
510+511	缺失	缺失	1
野生型△	—	—	4
敏感株			
野生型△	—	—	15
合计			60

*：大肠埃希菌的 rpoB 基因编号；△：指被检测菌株的 RRDR 区与标准株 H37Rv 的 rpoB 基因片段的核酸序列完全匹配；—：表示无数据。



A：野生型；B：516 位点突变；C：526 位点突变；D：531 位点突变。

图 2 常见位点测序结果

2.6 kasA 基因检测结果 存在 23 种突变，均为单碱基突变，未发现常见突变 269 突变和 312 突变。

3 讨 论

利福平和异烟肼是治疗结核分枝杆菌感染的首选药物，特别是在短期治疗中起到重要的作用。耐多药结核的产生给患者治疗带来更大困难，包括治疗费用增加、治愈率下降、病死率增高等。目前，结核病的控制情况不容乐观，相关保障措施不够，耐药结核病的控制亟待开展，诊断耐多药/广泛耐药结核病还面临很大的挑战[2]。针对日益严重的结核病疫情，早期鉴定结核耐药已成为迫切需要。利用培养的方法进行结核菌药敏试验是临床分离结核分枝杆菌药物敏感性的标准方法，但由于其培养周期太长，不能及时满足临床治疗的需要，因此检测结核分枝杆菌对常用抗结核药物的耐药位点突变情况，是快速了解结核分枝杆菌对常用抗结核药物是否敏感的重要途径。

本研究发现，结核分枝杆菌 rpoB 基因发生突变是利福平耐药的主要原因，突变主要发生在 RRDR，这一区域中不同位点突变的频率不同，其中主要以 531、526 和 516 为主[3-6]。rpoB 基因是细菌 RNA 聚合酶的 β 亚基的编码基因，当 RRDR 突变时，DNA 依赖的 RNA 聚合酶 B 亚单位结构发生改变，从而发生耐药[7]。本研究结果表明，15 株敏感株在 rpoB 中均未发生突变，45 株耐药株中有 41 株在 rpoB 发生了突变，共有 12 种突变形式，其中最主要的突变形式 Ser531Leu(51.2%)，其次为 526、516、533 等密码子突变。在 41 株突变菌株中，32 株为单碱基突变，7 株为双碱基突变，1 株 3 个碱基突变，1 株出现 510 和 511 位点缺失，主要以单点突变为主。本研究与 2010 年报道的广东地区 rpoB 基因突变的结果相似，说明快速检测这些位点是否存在突变可作为判断结核分枝杆菌是否对利福平耐药的依据[8]。但本次测序结果有 1 株结核分枝杆菌出现了 510 和 511 的缺失，说明 rpoB 基因 RRDR 可能不是结核分枝杆菌生存所必须。与国外报道相比，531 的突变频率有所降低。各地 rpoB 基因位点突变频率的不同，可能与当地结核病的传播途径和进化有关。

本研究选取异烟肼常见耐药基因突变进行检测，探讨其在深圳地区耐药相关基因的突变特点。异烟肼主要通过抑制结核分枝杆菌分枝菌酸的生物合成，导致细菌细胞壁破损，从而杀灭细菌。异烟肼的耐药机制非常复杂，涉及 katG、inhA、oxyR-ahpC、kasA 和 ndh 等基因[8]。根据国内外报导，katG315 位点和 inhA-15 位点占异烟肼耐药的 80% 以上[9-11]。在本次测序结果中，共有 29 株存在 katG315 突变，其中包括 28 株 katG315(AGC-ACC) 和 1 株 katG315(AGC-AAC)，9 株存在 inhA-15(C-T) 突变，同时存在 katG315 和 inhA-15 位点突变的共有 3 株，但是本研究并未发现已有文献报道的 katG279 位点突变和 inhA-8 位点突变[12-14]。同时本次测序未发现 kasA 基因常见突变位点 kasA269 和 kasA312 突变，说明在深圳地区由于 kasA 基因突变导致异烟肼耐药的发生频率较低，或也不排除是因为样本量较少或者抽样原因导致。

本研究采用基因测序的方法来分析结核分枝杆菌临床分离株对利福平和异烟肼耐药基因的特点，为建立快速检测结核分枝杆菌耐药基因提供实验室依据。

参考文献：

[1] Ramirez MV, Cowart KC, Campbel PJ, et al. Rapid detection of Multidrug-Resistant mycobacterium tuberculosis by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4003-4009.

[2] 陈明亭. 全球结核病控制和患者治疗耐多药/广泛耐药结核病高负担国家部长级会议在京召开[J]. 中国防痨杂志, 2009, 31(5): 320.

[3] Ong DC, Yam WC, Siu GK, et al. Rapid detection of Rifampicin and isoniazid-resistant mycobacterium tuberculoses by high resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1047-1054.

[4] Herna′ndez-Neuta I, Varela A, Martin A, et al. Rifampin-isoniazid oligonucleotide typing: an alternative format for rapid detection of multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4386-4391.

[5] 杨松，钟敏，张耀亭，等. 耐多药结核分枝杆菌基因突变分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(6): 412-425.

[6] 黄振宇，范学工. 210 株结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 突变特征研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(6): 548-550.

[7] 俞学锋，钟利. 结核分枝杆菌耐药机制研究进展[J]. 西南军医, 2010, 12(1): 125-127.

[8] 许蕴怡，李冰，谭守. 广东地区结核分枝杆菌利福平耐药与基因 rpoB 突变关系分析[J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(23): 2838-2842.

[9] Choi GE, Lee SM, Yi JY, et al. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis clinical isolates [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 3893-3898.

[10] Chen XY, Kong F, Wang Q, et al. Rapid detection of isoniazid, rifampin and ofloxacin resistance in mycobacterium tuberculosis clinical isolates using high resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 3025-3035.

[11] Wang FF, Shen HB, Guan M, et al. High-resolution melting facilitates mutation screening of rpsL gene associated with streptomycin resistance in mycobacterium tuberculosis[J]. Microbiolo Res, 2011, 166(2): 121-128.

[12] Wu XQ, Lu Y, Zhang JX, et al. Detection of the mutations in katG315 and inhA-15 of mycobacterium tuberculosis strains isolated from Chinese patients[J]. Chin Med J, 2006, 119(3): 230-233.

[13] Kozhamkulov U, Akhmetova A, Rakhimova S, et al. Molecular characterization of rifampicin- and isoniazid-resistant mycobacterium tuberculosis strains isolated in kazakhstan[J]. Jpn J Infect Dis, 2011, 64(3): 253-255.

[14] Hazbón MH, Brimacombe M, Bobadilla del Valle M, et al. Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(8): 2640-2649.

（收稿日期：2012-06-09 修回日期：2012-08-22）