

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.10.021

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190212.1249.010.html(2019-02-12)

南宁市某医院 2014—2017 年结核分枝杆菌 rpoB、katG 和 inhA 突变监测分析*

韦善求¹,麻秋英¹,罗顺达¹,倪祖彦¹,文乐敏^{2△}

(广西壮族自治区南宁市第四人民医院:1.检验科;2.医务部 530023)

[摘要] **目的** 了解某院结核分枝杆菌 rpoB、katG 和 inhA 突变特征及耐药性。**方法** 采集经聚合酶链反应(PCR)鉴定为结核分枝杆菌的标本 2 624 份,采用线性探针(LipA)法检测 rpoB、katG 和 inhA 突变。**结果** 2 072 份结果有效,rpoB、katG 及 inhA 突变率依次是 14.77%、12.11%及 2.80%;相关利福平、异烟肼耐药率及耐多药率为 14.77%、14.62%、9.60%。异烟肼耐药株中 katG 315 位突变占 82.84%,rpoB 突变株中突变频率居前的位点是 531(63.40%)、H526Y 或 H526D(11.11%)、其他 H526(8.50%),突变类型中“突变型探针出现并对应野生型探针缺失”占 81.37%。**结论** 该院结核分枝杆菌 rpoB、katG 和 inhA 突变特征与国内文献报道相近,相关利福平、异烟肼耐药率及耐多药率高于广西平均水平。

[关键词] 广泛耐药结核;结核分枝杆菌;rpoB/katG/inhA;耐药;线性探针技术

[中图分类号] R378.91

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)10-1709-04

Analysis on mutation monitoring of *Mycobacterium tuberculosis* rpoB, katG and inhA in a hospital in Nanning city from 2014 to 2017*

WEI Shanqiu¹, MA Qiuying¹, LUO Shunda¹, NI Zuyan¹, WEN Leming^{2△}

(1. Clinical Laboratory; 2. Medical Department, the Fourth People's Hospital of Nanning City, Nanning, Guangxi 530023, China)

[Abstract] **Objective** To understand the mutation characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* rpoB, katG and inhA genes and drug resistance in our hospital. **Methods** A total of 2 624 samples identified by PCR as *Mycobacterium tuberculosis* were collected. The mutation in rpoB, katG, and inhA genes were determined by Liner probe Assay (LipA). **Results** The results of 2 072 cases were valid. The mutation rate of rpoB, katG, and inhA was 14.77%, 12.11%, and 2.80%, respectively. The drug resistance rate of rifampicin, isoniazid and multi-drug resistance rate was 14.77%, 14.62%, and 9.60%, respectively. Among the isoniazid-resistant mutants, the katG 315 mutation accounted for 82.84%. And among the rpoB mutants the top three mutation sites were 531(63.40%), H526Y or H526D(11.11%), and other H526 (8.50%) location. In the mutation type, "mutant probes appearing and corresponding wild type missing" accounted for 81.37%. **Conclusion** The mutation characteristics of rpoB, katG, and inhA genes in *Mycobacterium tuberculosis* identified in this hospital are similar to those reported in the domestic literature. The related drug resistance rates of rifampicin, isoniazid and multi-drug are higher than the average rate in Guangxi region.

[Key words] extensively drug-Resistant tuberculosis; mycobacterium tuberculosis; rpoB/katG/inhA; drug resistance; linear probe technology

耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)治愈率低、病死率高,是全球性的难题和挑战。中国是全球 22 个结核病高负担国家之一^[1],耐药率及广泛耐药率均高于全球平均水平。近年发现 MDR-TB 有直接传播的证据,其中诊断延迟是重要的高危因素^[2]。药敏试验是我国诊断结核菌耐药的金标准,但时间长约 2~3 个月,是影响耐药结核病疗效和传染源控制的重要因素。线性探针技术(lineprobe assay, LipA)通过检测结核分枝杆菌(mycobacterium

tuberculosis, MTB) rpoB、katG 和 inhA 突变预测利福平(rifampicin, RFP)和异烟肼(isoniazid, INH)耐药,最快 6 h 内完成检测,特异度和灵敏度高,被世界卫生组织(WHO)推荐应用于 MDR-TB 诊断^[3],这项技术在我国得到了广泛应用^[4]。2014 年起本院采用 LipA 技术对部分 MTB-DNA 阳性标本进行了 rpoB、katG 和 inhA 突变监测,及时为患者提供了用药指导,现将结果进行回顾分析,为本地区结核病耐药防控政策制定提供基础数据。

* 基金项目:广西壮族自治区南宁市科学研究与技术开发计划项目(20143146)。 作者简介:韦善求(1964—),主任技师,本科,主要从事病原微生物分子生物学研究。 △ 通信作者,E-mail:107324166@qq.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 随机选取 2014 年 1 月至 2017 年 12 月在本院进行 MTB-DNA 检测, 结果阳性且定量聚合酶链反应 (PCR) 循环阈值 (cycle threshold, CT) ≤ 20 的标本, 排除同一患者重复标本。MTB-DNA 阳性的判定符合《结核病实验室标准化操作与网络建设》^[5] 的相关标准。

1.1.2 主要试剂 MTB-DNA 试剂盒购自中山达安基因公司, Geno Type MTBDRplus 试剂盒购自德国 Hain Lifesciences 公司。

1.1.3 主要仪器 实时荧光 RCR 扩增仪购自美国 ABI 公司, RCR 扩增仪购自 Biometra 公司, TwinCubator[®] 杂交仪购自德国 Hain Lifesciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 用宽口螺旋盖无菌培养瓶采集下呼吸道痰液、肺泡灌洗液或脓性分泌物 1~3 mL 送检。

1.2.2 MTB-DNA 检测 在标本中加 1~2 倍体积 4% 氢氧化钠溶液, 涡旋振荡 30 s, 静置 15 min, 使标本均匀化。取 1 mL 加入 1.5 mL 离心管, 14 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。沉淀加灭菌生理盐水 1 mL 混匀, 14 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 再重复 1 次, 阳性质控品不需要均匀化, 处理方法与标本相同; 取 MTB 阴性、临界阳性质控品 8 000 r/min 离心 5 s, 吸 50 μ L 加入 1.5 mL 离心管中。在标本管和质控品管中加 50 μ L DNA 提取液, 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C 恒温处理 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 μ L 加入 PCR 反应管, 上机扩增。结果分析按照说明书要求执行。

1.2.3 rpoB, katG 和 inhA 突变检测 包括 4 个步骤: (1) DNA 提取, 选取 MTB-DNA 阳性且 CT ≤ 20 的标本, 沉淀物处理方法与 1.2.2 相同, 用 100 μ L 水中重悬沉淀物, 95 $^{\circ}$ C 干浴器上灭活 20 min, 超声波水浴中超声振荡 15 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 上清

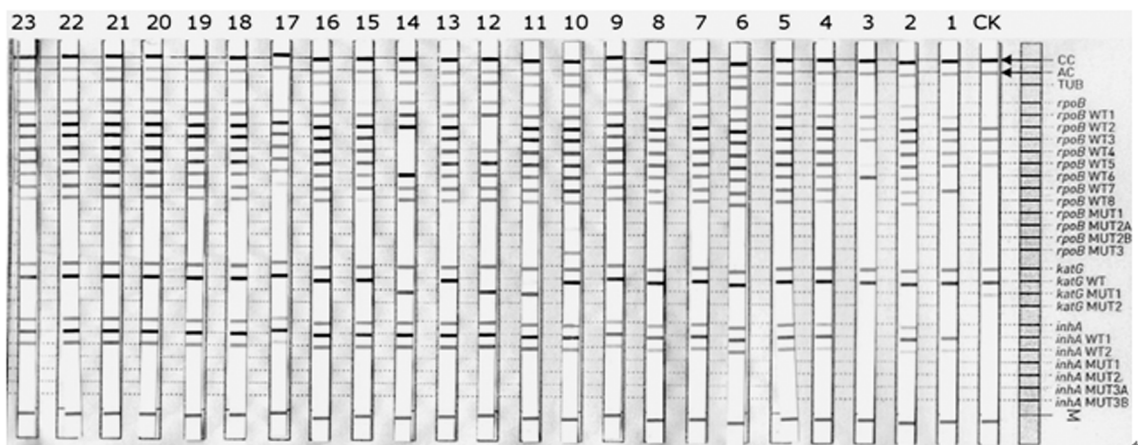
液即 DNA 模板。(2) 多重 PCR 扩增, 准备含有 DNA 聚合酶的扩增体系 45 μ L, 加 5 μ L DNA 模板上机扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 10 次; 95 $^{\circ}$ C 25 s, 53 $^{\circ}$ C 40 s, 70 $^{\circ}$ C 40 s, 循环 30 次; 70 $^{\circ}$ C 8 min。(3) 杂交: 扩增产物与 Gene Type MTBDRplus 试剂盒中的膜条进行杂交, 按说明书操作。(4) 结果判读: 试条上有 27 条反应带, 质控带 6 条包括标记物质控 CC、扩增质控 AC、确认结核分枝杆菌复合群 TUB 带、rpoB 及 katG 和 inhA 位点质控带; 11 条野生型探针带 (WT), 10 条突变探针带 (MUT), 当 6 条质控带均显色表示结果有效, 按以下规则判读: 某一基因区所有 WT 带均显色, 而无 MUT 带显色, 表示该基因区没有发生可检测的突变, 试验菌株对相应药物敏感; 若某基因区至少有 1 条 WT 带缺失或 (和) MUT 显色, 表示试验菌株对相应药物耐药; 若某基因区所有 WT 均显色, 但同时 MUT 显色, 提示标本中同时存在耐药株和敏感株 (异质性耐药)。

1.2.4 耐药判定 rpoB+katG 或 (和) inhA 突变判定为 MDR, katG 或 inhA 突变判定为耐 INH, rpoB 突变判定为耐 RFP, 无 rpoB, katG 和 inhA 突变判定为敏感, MDR 是指对一种以上的抗结核药物至少包括 RFP 和 INH 同时耐药。

1.3 统计学处理 检出率、耐药率及观察指标中各参数的构成比采用百分率方法进行统计。

2 结果

2.1 LipA 检测结果 部分结果见图 1。10 号条膜 rpoBWT 条带全部显色, MUT2B(+), 判定为 RFP 异质性耐药; 11 号条膜 [katGWT(-)MUT1(+)], 判定为 INH 耐药; 12 号条膜 [rpoBWT2/3(-)katGWT(-)MUT1(+)], 14 号条膜 [rpoBWT3/4/5(-)katGWT(-)MUT1(+)], 判定为 MDR; 5~9、13、16、18~22 号标本的 WT 带均显色, 无 MUT 显色, 判定为敏感株; 1~4、15、17 号条膜 TUB(-), 判定为试验失败。



CK 为空白对照; 23 号为 37RV 标准株; 10 号为 rpoB WT(+), MUT2B(+); 11 号为 katGWT(-), MUT1(+); 12 号为 rpoBWT2/3(-), katGWT(-), MUT1(+); 14 号为 rpoBWT3/4/5(-), katGWT(-), MUT1(+); 5~9、13、16、18~22 号均为 rpoBWT(+), katGWT(+), inhAWT(+), 及对应的 MUT(-); 1~4、15、17 号均为 TUB(-)

图 1 线性探针检测结果图

表 1 rpoB, KatG 和 inhA 主要突变类型及位点

基因	缺陷野生型探针	显色的突变带	突变位点	合计(n)
rpoB (n=306)	rpoBWT8	rpoBMUT3	S531L	186
	rpoBWT7	rpoBMUT2A	H526Y 或 H526D	30
	rpoBWT7	rpoBMUT2B ^b		
	rpoBWT7		其他 H526 ^a	26
	WT8		S531(P, Qb, W); L533P	11
	其他 rpoBWT ^c		507-533	42
		rpoBMUT3	S531L	7
		rpoBMUT2A	H526Y 或 H526D	2
		rpoBMUT2B ^b		
		rpoBMUT3/MUT2A	S531L/H526Y	1
	rpoBWT(2,3/4,8)	rpoBMUT2B	H526D	1
katG(n=245)	KatGWT	KatGMUT1	S315T1	217
	KatGWT	KatGMUT2	S315T2	6
	KatGWT	KatGMUT1/MUT2	S315T1/S315T2	1
		KatGMUT1	S315T1	19
		KatGMUT1/MUT2	S315T1/S315T2	2
inhA(n=52)	inhAWT1	inhAMUT1	C15T	49
	inhAWT1	inhAMUT1	A16G	3
katG+ inhA(n=6)	KatGWT/inhAWT1	KatGMUT1/inhAMUT1	S315T1/C15T	4
	KatGWT/inhAWT2	KatGMUT1/inhAMUT3A	S315T1/A16G	2

^a:包括 H526 (R, P*, Q*, N, L, S, C) 位点突变; ^b:罕见的突变, 仅在理论上能被检测到, 在体外可能检测不到这种突变; ^c:包括 rpoBWT1、2、3、2/3、3/4、4/5、5/6、7/8 野生型探针缺失

2.2 rpoB, katG 及 inhA 突变及其主要位点频率
 对 2 624 份标本进行 LipA 检测, 2 072 份结果有效, 菌株的主要突变类型及位点见表 1。rpoB 突变株中, 突变频率居前的 3 个位点是 S531L 位, 占 194 株 (63.40%)、H526Y 或 H526D 位, 分别占 34 株 (11.11%)、其他 H526 位, 占 26 株 (8.50%); INH 耐药相关突变包括 katG 突变 245 株、inhA 突变 52 株、katG 和 inhA 均突变 6 株, 其中 katG 315 位点突变 251 株 (82.85%)。rpoB, katG 及 inhA 突变率见表 2。

表 2 rpoB, katG 及 inhA 突变率[n(%)]

检测时间	病例数(n)	rpoB	katG	inhA
2014 年	426	76(17.84)	54(12.67)	17(3.99)
2015 年	648	91(14.04)	68(10.49)	19(2.93)
2016 年	510	73(14.31)	70(13.72)	12(2.35)
2017 年	488	66(13.52)	59(12.09)	16(3.27)
合计	2 072	306(14.77)	251(12.11)	58(2.80)

2.3 突变类型 WT 包括各种基因最重要的耐药区, MUT 是常见突变位点。根据“WT 是否缺失或(和)MUT 出现”分 4 种类型(表 3), 其中“MUT 出现并对应 WT 缺失”是热点突变型, “仅 MUT 出现”或“MUT 出现并 WT 缺失(非对应)”突变型是异质耐药型, 本研究共检测到 35 株异质性耐药菌, 突变型中

“MUT 出现并对应 WT 缺失”型占 81.37%。

表 3 rpoB, katG 和 inhA 突变类型[n(%)]

基因	MUT 出现并对应 WT 缺失	反 WT 缺失	反 MUT 出现	MUT 出现并 WT 缺失(非对应)	合计(n)
rpoB	216(70.58)	79(25.81)	10(3.26)	1(0.32)	306
katG	230(91.63)	0(0.00)	21(8.36)	0(0.00)	251
inhA	52(94.54)	0(0.00)	3(5.45)	0(0.00)	55
合计	498(81.37)	79(12.91)	34(5.55)	1(0.16)	612

2.4 相关耐药 根据基因突变与表型耐药的关系, 本组病例有 410 例耐药, 其中 303 例耐 INH, 306 例耐 RFP, 199 例 MDR(表 4)。在 rpoB 突变株中耐多药株占 65.03%(199/306), 从无 rpoB, katG 和 inhA 突变株中随机抽查同期进行 MTB 培养和药敏试验的患者 30 例, 药敏试验结果全部敏感。

表 4 rpoB, KatG 及 inhA 突变相关耐药[n(%)]

检测时间	TUB 阳性(n)	总耐药	MDR	耐 RFP	耐 INH
2014 年	426	91(21.36)	51(11.97)	76(17.84)	67(15.72)
2015 年	648	121(18.67)	56(8.64)	91(14.04)	85(13.11)
2016 年	510	104(20.39)	49(9.60)	71(13.92)	80(15.68)
2017 年	488	94(19.26)	43(8.81)	64(13.11)	71(14.54)
合计	2 072	410(19.79)	199(9.60)	306(14.77)	303(14.62)

3 讨 论

结核菌耐药的主要机制是因为基因突变导致药物作用靶位改变。RFP 耐药与 *rpoB* 突变有关,其中编码 507~533 氨基酸位点的 81 个碱基是其耐药决定区,RFP 耐药株中超过 95% 是在此区域发生突变;MTB 对异烟肼产生耐药与 *katG*、*inhA*、*kasA*、*ndh* 等多个基因突变有关,约有 34.6%~94.3% 在 *katG*315 位点发生突变,2.9%~21.5% 在 *inhA* 启动子区域发生突变。LipA 法就是通过检测 *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 突变快捷获得 MDR 信息,目前已经在临床推广应用。

根据文献资料,湖南^[6]、四川^[7]和云南^[8]地区结核病患者 *rpoB* 的突变频率分别为 13.09%、28.85%、35.39%,*katG* 的突变频率分别为 10.05%、21.19%、30.15%,*inhA* 的突变频率分别为 1.55%、3.31%、21.76%,本研究结果与湖南地区一致,但低于云南和四川地区,显示我国不同地域 MTB 耐药基因突变频率存在差异性。在耐药性方面,本院 MTB 耐多药率、INH 及 RFP 耐药率低于重庆肺科医院(16.70%、33.20%、32.94%)^[9],高于浙江省疑似结核病患者(6.66%、13.24%、9.78%)^[10],也高于广西 2010~2011 年抽样调查的数据(6.28%、12.10%、8.28%)^[11],而与广西某结核病治疗医院培养法检测的结果相近(10.97%、17.43%、16.78%)^[12],表明结核病定点治疗医院就诊者中难治、复治的患者相对较多,耐药情况相对严重,同时间接说明 LipA 法用于一线抗结核药物耐药的快速筛查是可行的。本院 2 072 例结核病患者中有 19.79% 对一线抗结核药物耐药,对这些感染者如果按照经验性使用国家推荐的标准方案(2H-R-Z-E/4H-R 或 2H2-R2-Z2-E2/4H2-R2)治疗,结果是无效或是效果不佳,因此对于涂片阳性或 MTB-DNA 阳性的患者早期进行基因型耐药检测十分必要,这对提高结核病治愈率和控制 MDR-TB 疫情将有很好促进作用。

本资料中,*rpoB* 531、*katG*315 位点的突变频率与浙江^[10]、湖北^[13]和北京^[14]地区的报道基本一致;耐 RFP 株中耐多药占 65.03%,提示 *rpoB* 突变后进一步转化为 MDR 的概率高,可以作为诊断 MDR-TB 的分子标志。已知 *katG* 和 *inhA* 突变与不同耐药水平相关,*katG* 突变往往显示高水平耐药($>1 \mu\text{g/mL}$),*inhA* 突变显示低水平耐药($<1 \mu\text{g/mL}$),本研究中 *katG* 突变占 INH 耐药相关突变的 82.84%,说明本地区 MTB 对 INH 主要呈现高水平耐药。

异质性耐药是指在同一标本中同时存在敏感菌和耐药菌的现象,主要由于敏感和耐药菌株共感染或敏感菌株部分亚群发生耐药突变所致。LipA 法检测表现为,当 MTB 中耐药亚群比例高于其方法学灵敏度时,突变型和野生型基因序列可同时被检出,但表型是否耐药取决于突变与非突变基因序列的比例。本研究中 35 株表现为“MUT 出现并无对应 WT 缺

失”,说明标本中同时存在敏感株和耐药株。因此,对于异质性耐药的患者需要进一步做药敏试验以观察其表型耐药情况,如果菌株暂时保持药物敏感性时,需要持续关注其耐药变化,以便指导及时调整治疗。

结核菌耐药除了基因突变机制外,还有药物外排泵机制、外膜蛋白缺失或数量减少以及其他未知的机制等。LipA 法仅检测结核分枝杆菌复合群由 *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 区突变引起的耐药,由其他耐药机制引起的耐药则不能检测。所以 LipA 法主要适用于 MDR-TB 快速筛查而不能取代药敏试验。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016[M]. Geneva: World Health Organization, 2016: 1-81.
- [2] 武洁,唐利红,杨崇广,等.全基因组测序技术在结核病流行病学调查中的应用[J].中华流行病学杂志,2016,37(12):1644-1646.
- [3] World Health Organization. Implementing tuberculosis diagnostics. Policy framework[M]. Geneva: World Health Organization, 2015:1-39.
- [4] 李永文,李新旭,邓云峰,等.中国开展 GenoType MTB-DRplus 检测结核分枝杆菌对异烟肼和利福平耐药性的 Meta 分析[J].中华传染病杂志,2016,34(8):494-500.
- [5] 赵雁林.结核病实验室标准化操作与网络建设[M].北京:人民卫生出版社,2013:69-265.
- [6] 邓叶华.湖南省结核病耐药情况分析及其耐药突变位点分布[D].衡阳:南华大学,2016.
- [7] 多丽娜,王婷婷,宋兴勃,等.分子线性探针技术分析四川地区结核分枝杆菌耐药情况[J].南方医科大学学报,2011,31(5):822-824.
- [8] 马利,茹浩浩,陈连,等.线性探针法检测云南地区结核分枝杆菌耐药的应用评价[J].临床检验志,2015,33(8):573-576.
- [9] 程曦,李亚斐,饶英,等.2 217 例结核病患者耐药情况的流行病学特征分析[J].重庆医学,2015,44(2):1635-1637.
- [10] 徐凯进,嵇仲,康胡海,等.浙江省 12 个区(县)分枝杆菌菌种鉴定及耐药相关基因特征分析[J].中国防痨杂志,2017,39(2):154-157.
- [11] 蓝如束,蓝兰,黄曙海,等.广西壮族自治区涂阳肺结核患者的耐药性分析[J].中国防痨杂志,2013,35(9):673-677.
- [12] 李无名,唐柳生,李勇,等.1067 例结核病患者耐药情况分析[J].广西医学,2014,36(6):780-782.
- [13] 汪明,袁永乐,刘乐,等.MTBDRplus 方法快速检测结核分枝杆菌耐药性的研究[J].国际呼吸杂志,2015,35(21):1601-1605.
- [14] 孙倩,张倩,张治国. Genotype MTBDRplus 检测结核分枝杆菌耐药性的临床应用研究[J].国际检验医学杂志,2018,39(4):392-385.