

结核分枝杆菌临床分离株对四种注射用抗结核药物耐药及交叉耐药分析

常珊 付育红 李琦 卜建玲 黄海荣 马珂 陈效友

【摘要】 目的 探讨链霉素(S)、卡那霉素(Km)、阿米卡星(Am)和卷曲霉素(Cm)对结核分枝杆菌的耐药及交叉耐药情况,为耐药结核病的化学治疗提供理论依据。**方法** 对首都医科大学附属北京胸科医院 2004 年 1 月至 2010 年 12 月间 4247 株临床分离株的药物敏感试验结果进行分析。采用绝对浓度法进行药物敏感试验。4 种药物之间总耐药率的差异采用配对 χ^2 检验及 χ^2 分割法,以 $P < 0.007 14$ 为差异有统计学意义。4 种药物之间交叉耐药率的差异采用两个样本率比较的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。**结果** 4247 份临床分离株标本中,S 的耐药率为 45.11%(1916/4247),Km 的耐药率为 17.93%(718/4005),Am 的耐药率为 19.02%(792/4164),Cm 的耐药率为 9.44%(401/4247)。经配对 χ^2 检验,Cm 与 S、Am、Km 之间耐药率差异有统计学意义, χ^2 值分别为 1349.34、281.54、193.16, P 值均小于 0.007 14。经配对 χ^2 检验,S 与 Am、Km 之间耐药率差异有统计学意义, χ^2 值分别为 821.10、869.28, P 值均小于 0.007 14。经配对 χ^2 检验,Am 与 Km 之间耐药率差异有统计学意义, χ^2 值为 13.98, P 值小于 0.007 14,耐药率从高到低依次为 S、Am、Km 和 Cm。S 在其他 3 种药物的耐药株中的耐药率分别为 82.59%(耐 Km 株,593/718)、77.78%(耐 Am 株,616/792)、76.81%(耐 Cm 株,308/401), χ^2 值分别为 502.959、453.911、626.654, P 值均小于 0.05。Km 在另外 3 种药物耐药株中的耐药率分别为 33.13%(耐 S 株,593/1790)、83.31%(耐 Am 株,634/761)、67.89%(耐 Cm 株,260/383), χ^2 值分别为 502.959、12.079、100.536, P 值均小于 0.05。Am 在另外 3 种药物耐药株的耐药率分别为 32.78%(耐 S 株,616/1879)、89.55%(耐 Km 株,634/708)、77.95%(耐 Cm 株,304/390), χ^2 值分别为 453.911、12.079、163.761, P 值均小于 0.05。Cm 在其他 3 种药物的耐药株中的耐药率分别为 16.08%(耐 S 株,308/1916)、36.21%(耐 Km 株,260/718)和 38.38%(耐 Am 株,304/792), χ^2 值分别为 626.654、100.536、163.761, P 值均小于 0.05。**结论** 4 种注射用抗结核药物的耐药率从高到低依次为 S、Am、Km 和 Cm。4 种药物之间均表现出交叉耐药,但程度不同。S 与其他 3 种药物之间为单向耐药,Km 和 Am 两个药物之间近似完全交叉耐药,Cm 是其他 3 种药物耐药时的选择药物。

【关键词】 分枝杆菌, 结核; 链霉素; 卡那霉素; 阿米卡星; 卷曲霉素硫酸盐; 抗药性, 细菌

Analysis on drug resistance and cross resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical samples to four injectable antituberculous drugs CHANG Shan, FU Yu-hong, LI Qi, BU Jian-ling, HUANG Hai-rong, MA Yu, CHEN Xiao-you. The 3rd Department of Tuberculosis, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

Corresponding author: CHEN Xiao-you, Email: chenxy1998@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the drug resistance and the cross resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical samples to streptomycin (S), kanamycin (Km), amikacin (Am) and capreomycin (Cm) and to provide scientific evidences for clinical treatment of drug resistance tuberculosis. **Methods** A retrospective study was adopted to analyze the results of drug susceptibility testing (DST) with absolute concentration method of 4247 isolates from patients with tuberculosis in Beijing Chest Hospital from Jan. 2004 to Dec. 2010. Matched Chi-square test and partition of chi-square were applied for the overall drug resistant rate analysis, while chi-square test was applied to compare the cross resistance to 4 injectable antituberculous drugs. **Results** The drug resistant rates to the four drugs were 45.11%(S, 1916/4247), 17.93%(Km, 718/4005), 19.02%(Am, 792/4164) and 9.44%(Cm, 401/4247) among 4247 resistant isolates respectively. The differences were statistically significant by matched χ^2 -test and partitions of χ^2 method. The values of χ^2 were 1349.34 (Cm/S), 281.54 (Cm/Am) and 193.16 (Cm/Km) ($P < 0.007 14$) respectively. For the drug resistant rates of S/Am and S/Km, the values of χ^2 were

821.10 (S/Am) and 869.28 (S/Km) ($P < 0.00714$) respectively. The value of χ^2 was 13.98 (Am/Km) ($P < 0.00714$). The drug resistant rates sequencing from up to down were S, Am, Km and Cm. The drug resistant rates to S among the other 3 drug-resistance isolates were 82.59% (Km resistant isolates, 593/718), 77.78% (Am resistant isolates, 616/792) and 76.81% (Cm resistant isolates, 308/401) respectively. The values of χ^2 were 502.959, 453.911 and 626.654 ($P < 0.05$). The drug resistant rates to Km among the other 3 drug-resistance isolates were 33.13% (S resistant isolates, 593/1790), 83.31% (Am resistant isolates, 634/761) and 67.89% (Cm resistant isolates, 260/383) respectively. The values of χ^2 were 502.959, 12.079 and 100.536 ($P < 0.05$). The drug resistant rates to Am among the other 3 drug-resistance isolates were 32.78% (S resistant isolates, 616/1879), 89.55% (Km resistant isolates, 634/708) and 77.95% (Cm resistant isolates, 304/390) respectively. The values of χ^2 were 453.911, 12.079 and 163.761 ($P < 0.05$). The drug resistant rates to Cm among the other three drug resistance isolates were 16.08% (S resistant isolates, 308/1916), 36.21% (Km resistant isolates, 260/718) and 38.38% (Am resistant isolates, 304/792) respectively. The values of χ^2 were 626.654, 100.536 and 163.761 ($P < 0.05$).

Conclusion The drug resistant rates sequencing from up to down of four injectable antituberculous drugs are streptomycin, amikacin, kanamycin and capreomycin. There are cross resistances among these four drugs with different levels. Streptomycin is unidirectional resistant to the other three drugs. Kanamycin and amikacin are almost full cross-resistant. Capreomycin is the candidate drug when the other three drugs are resistant.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Streptomycin; Kanamycin; Amikacin; Capreomycin sulfate; Drug resistance, bacterial

WHO 2010 年报告^[1],我国在耐多药结核病患者数量最多的 5 个国家中居首位。2008 年全国耐药结核病学基线调查报告指出^[2],我国结核病总耐药率 37.39%,耐多药率 8.32%,广泛耐药率 0.68%,2010 年全国第五次结核病流行病学调查^[3]结果报告耐多药率为 6.8%,由此可估算我国近 5 年每年新发耐多药结核病患者约 9.8 万~12 万例,远高出全球平均水平,防控形势十分严峻。链霉素(S)、卡那霉素(Km)、阿米卡星(Am)和卷曲霉素(Cm)均属于注射用抗结核药物,是耐药结核病治疗方案中的重要组成部分。由于对这四种药物之间的交叉耐药关系一直存在争议,为了更好地使用这一类药物,组成更合理的耐药结核病的治疗方案,笔者对本院 2004—2010 年所有的临床分离株的 4 种注射剂的耐药情况进行分析,并报告如下。

材料和方法

一、菌株来源

4247 份结核分枝杆菌临床分离株来自 2004 年 1 月至 2010 年 12 月北京胸科医院就诊 4247 例患者的痰液标本,所有阳性菌株经对硝苯甲酸(PNB)及噻吩二羧酸肼(TCH)进行菌种鉴定为结核分枝杆菌。其中:2004 年 256 份,2005 年 353 份,2006 年 335 份,2007 年 631 份,2008 年 711 份,2009 年 988 份,2010 年 973 份。来源患者中男 2629 例,女 1618 例;年龄 3~92 岁,平均年龄(49.32±8.71)岁。

二、培养方法及药物敏感试验

所有菌株采用改良罗氏培养基进行结核分枝杆菌培养,两浓度的绝对浓度法进行药物敏感试验,S、Km、Am 和 Cm 的药物敏感试验方法参照文献

[4],4 种药物耐药菌株的入选均以每种药物 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含药培养基上生长菌落占据 1/4 斜面及以上(+~+++++)作为标准。4 种药物均购自美国 Sigma 公司。质控菌株为 H37Rv(ATCC27294)标准株,为本院参比实验室保存。

三、统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据统计处理,4 种药物之间总耐药率的差异采用配对 χ^2 检验及 χ^2 分割法,以 $P < 0.00714$ 为差异具有统计学意义。4 种药物之间交叉耐药率的差异采用两个样本率比较的 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 总体耐药情况:总计 4247 份标本中,S 的耐药率为 45.11% (1916/4247),Km 的耐药率为 17.93% (718/4005),Am 的耐药率为 19.02% (792/4164),Cm 的耐药率为 9.44% (401/4247)。经配对 χ^2 检验,Cm 与 S、Am、Km 之间耐药率差异有统计学意义, χ^2 值分别为 1349.34、281.54、193.16, P 值均 < 0.00714 。经配对 χ^2 检验,S 与 Am、Km 之间耐药率差异有统计学意义, χ^2 值分别为 821.10、869.28, P 值均 < 0.00714 。经配对 χ^2 检验,Am 与 Km 之间耐药率差异有统计学意义, χ^2 值为 13.98, P 值 < 0.00714 。因此,4 种药物的耐药率以 S 的耐药率最高,Cm 的耐药率最低,Am 排在 S 之后,Km 排在 Am 之后,即 $S > \text{Am} > \text{Km} > \text{Cm}$ 。4 种药物耐药率在不同年份的具体数值及总体耐药率的结果见表 1。从近 7 年的耐药率变化来看,S 的耐药率一直高于其他 3 种药物,且较为稳定,

表 1 4247 份标本 4 种药物的总耐药率

年份	S	Km	Am	Cm
2004	113/256(44. 14)	31/256(12. 11)	24/173(13. 87)	25/256(9. 77)
2005	184/353(52. 12)	41/353(11. 61)	42/353(11. 90)	13/353(3. 68)
2006	133/335(39. 70)	33/335(9. 85)	34/335(10. 15)	11/335(3. 28)
2007	275/631(43. 58)	38/389(9. 77)	68/631(10. 78)	33/631(5. 23)
2008	326/711(45. 85)	133/711(18. 71)	146/711(20. 53)	31/711(4. 36)
2009	493/988(49. 90)	279/988(28. 24)	307/988(31. 07)	190/988(19. 23)
2010	392/973(40. 29)	163/973(16. 75)	171/973(17. 57)	98/973(10. 07)
合计	1916/4247(45. 11)	718/4005(17. 93)	792/4164(19. 02)	401/4247(9. 44)

注 表中分子代表耐药标本数(份),分母代表总标本数(份);括号内数值为总耐药率(%)

另外 3 种药物的耐药率在 2008 年及 2009 年出现了小幅度的升高,到 2010 年又有所下降。

2. 交叉耐药情况:(1)S 在 Km、Am 和 Cm 3 种耐药株中的耐药率分别为 82. 59% (593/718)、77. 78% (616/792) 和 76. 81% (308/401)。经统计学处理, χ^2 值分别为 502. 959、453. 911、626. 654, P 值均 $\leq 0. 05$ 。(2)Km 在 S、Am 和 Cm 3 种耐药株中的耐药率分别为 33. 13% (593/1790)、83. 31% (634/761) 和 67. 89% (260/383)。经统计学处理, χ^2 值分别为 502. 959、12. 079、100. 536, P 值均 $\leq 0. 05$ 。(3)Am 在 S、Km 和 Cm 3 种耐药株的耐药率分别为 32. 78% (616/1879)、89. 55% (634/708) 和 77. 95% (304/390)。经统计学处理, χ^2 值分别为 453. 911、12. 079、163. 761, P 值均 $\leq 0. 05$ 。(4)Cm 在 S、Km 和 Am 3 种耐药株中的耐药率分别为 16. 08% (308/1916)、36. 21% (260/718) 和 38. 38% (304/792)。经统计学处理, χ^2 值分别为 626. 654、100. 536、163. 761, P 值均 $\leq 0. 05$ 。

讨 论

本资料分析结果显示,4 种药物总的耐药率由高到低依次为 S (45. 11%)、Am (19. 02%)、Km (17. 93%)、Cm (9. 44%)。4 种药物耐药率高低顺序结果与 2008 年王生伟等^[5]报道一致。施旭东等^[6]2004 年报道 1046 份改良罗氏培养药物敏感性试验结果显示, S 耐药率 30. 3%, Km 耐药率 10. 5%, Am 耐药率 8. 2%, Cm 耐药率 3. 3%, 本研究中 4 种药物的耐药率与之比较都偏高,可能与样本量的大小、标本来源于不同地区及 4 种药物的近 6 年来使用频率不同有关。本研究结果提示 Am 的耐药率略高于 Km 耐药率,与施旭东等^[6]研究结果不同,可能与近几年来 Am 的使用率高于 Km 有关。另从近 7 年耐药率变化来看,4 种药物的耐药

率都呈现出逐渐上升的趋势,但 2010 年的耐药率又有所回落。2010 年全国第五次流调结果与 2008 年耐药结核病基线调查报告的结果相比较,耐多药率是有所下降的,本研究结果与此变化趋势是一致的,2010 年 4 种药物耐药率的下降可能与耐多药结核病比率下降有关。

这 4 种药物均为注射用抗结核药物。除 Cm 为环多肽类药物外,其他 3 种均属于氨基糖甙类药物。两类药物均以抑制细菌蛋白质的合成为主要机制,但作用靶点不完全相同^[7]。自氨基糖甙类药物诞生起,即陆续出现对这类药物存在交叉耐药现象的报道。交叉耐药是指细菌对一种抗菌药产生耐药后,对其他作用机制相似的抗菌药也产生耐药性。通常认为 S 与 Km 和 Am 为单向交叉耐药,Km 和 Am 之间为完全交叉耐药,这 3 种药物与 Cm 之间为单向交叉耐药^[7]。但文献报道结果并非完全一致。1987 年,岩井和郎等^[8]认为 S 与 Km 为单向交叉耐药,但 Km 和 Cm 之间为完全交叉耐药。倪正义等^[9]报道,对 Am 低度耐药的患者有 92. 1%对 Km 仍然有效,而对 Km 低度耐药者仅 36. 4%对 Am 敏感。上海曹广云等^[10]报道 448 例药敏结果显示,S 在 Am 耐药株和 Cm 耐药株中的耐药率分别为 96. 7%和 91. 2%,而 Am 在 S 耐药株中的耐药率为 31. 2%,Cm 在 S 耐药株中的耐药率为 27. 5%,因此可以认为 S 与 Am 和 Cm 之间为单向交叉耐药。而 Am 在 Cm 耐药株中耐药率为 82. 5%,Cm 在 Am 耐药株中的耐药率为 77%,因此认为两种药物为双向交叉耐药。国外关于 4 种药物的交叉耐药情况结果也不完全一致,特别是 Am 和 Km 之间的交叉耐药情况,差别较大,但通常样本量较小。如 Kruuner 等^[11]和 Maus 等^[12]的两个研究报道各约 80 例样本中,耐 Km 株中仍有 50%左右对 Am 敏感。2009 年 Jugheli 等^[13]报道 78 例 Km 耐药株中 11. 5%对 Am

敏感,20.5%对 Cm 敏感,而 Am 耐药株中未见到 Km 敏感株。本研究结果显示,S 在另外 3 种药物耐药株中的耐药率为 76.81%~82.59%,而另外 3 种药物在 S 耐药株中的耐药率为 16.08%~33.13%,据此认为 S 与另外 3 种药物虽然存在交叉耐药,但耐药率差别较大,交叉耐药水平较低,可认为 S 与其他 3 种药物之间均为单向交叉耐药,与曹广云等^[10]研究结果一致。Cm 在另外 3 种药物耐药株中的耐药率为 16.08%~38.38%,另外 3 种药物在 Cm 耐药株中的耐药率为 67.89%~77.95%,因此 Cm 与另外 3 种药物之间也应为单向交叉耐药。2008 年,耐药结核病规划管理指南紧急修订版中也认为 Cm 和其他氨基甙类药物之间有低水平交叉耐药^[14]。最后,本研究结果显示,Km 耐药株中 Am 的耐药率为 89.55%,Am 耐药株中 Km 的耐药率为 83.31%,两者差异虽有统计学意义,但 χ^2 值远远小于其他几组药物,且从临床实际出发,此交叉耐药率的差别过小,应认为两者为完全交叉耐药。提示,在临床用药中,应优先推荐遵从 S 到 Am 到 Cm 的单向用药顺序,另当 S 耐药时可选择使用 Am 或者是 Km,当 Am 和 Km 耐药时可以选择使用 Cm。

目前研究认为,4 种药物交叉耐药产生的原因是由于存在共同的基因突变位置。如 S 的耐药主要由于 *rspl* 和(或)*rrs* 基因突变所致^[15]。其他 3 种药物耐药均有 *rrs* 基因突变参与^[13]。而 Cm 的耐药产生与 *rrs*、*thyA* 及 *gidB* 3 个基因突变均有关联^[16]。其中 Km 和 Am 的耐药产生均与 *rrs1401* 位点的突变密切相关,特别是高浓度耐药时,其基因型和表型的关联更为密切^[17,18]。多个文献报道均发现不同形式、不同程度的交叉耐药经常表现为不同形式的基因突变^[12,16,18]。但本研究并未对 4 种药物耐药株的相关耐药基因突变情况进行检测和分析,因此尚不能从基因水平说明 4 种药物交叉耐药的分子机制。

从本研究所总结的 7 年的临床资料来看,4 种药物的耐药率从高到低依次为 S、Am、Km、Cm,4 种药物之间均表现出交叉耐药,但程度不同。S 与其他 3 种药物之间为单向耐药,Km 和 Am 两个药物之间近似完全交叉耐药,Cm 与其他 3 种药物之间为单向耐药。

参 考 文 献

- [1] WHO. 耐药结核病临床医生使用指南. 2 版. 北京:中国疾病预防控制中心结核病防治中心, 2010.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告 (2007—2008 年). 北京:人民卫生出版社, 2010.
- [3] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告. 中国防痨杂志, 2012, 34(8):485-508.
- [4] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程. 中国防痨杂志, 1996, 18(1):28-33.
- [5] 王生伟,张侠. 1996—2006 年南京地区结核病耐药状况分析. 中国防痨杂志, 2008, 30(5):408-410.
- [6] 施旭东,王雷. 卷曲霉素对结核分枝杆菌体外抑菌作用的研究. 江苏大学学报医学版, 2004, 14(2):100-102.
- [7] 肖和平. 唐神结. 耐药结核病防治手册. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [8] 岛尾忠雄. 结核病学. 北京:人民卫生出版社, 1987.
- [9] 倪正义,熊建刚,凡毅. 丁胺卡那与卡那霉素对结核杆菌的交叉耐药情况分析. 医师进修杂志, 2000, 23(7):10.
- [10] 曹广云,肖和平,闫丽萍,等. 三种注射用抗结核药物对结核分枝杆菌的耐药情况分析. 中国防痨杂志, 2010, 32(4):227-230.
- [11] Krüüner A, Jureen P, Levina K, et al. Discordant resistance to kanamycin and amikacin in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(9):2971-2973.
- [12] Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8):3192-3197.
- [13] Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, et al. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12):5064-5068.
- [14] WHO. 耐药结核病规划管理指南. 2008 年紧急修订版. 北京:中国疾病预防控制中心结核病防治中心, 2008.
- [15] 吴雪琼. 结核分枝杆菌耐链霉素分子机制的研究进展. 微生物学免疫学进展, 1998, 26(3):83-85.
- [16] Via LE, Cho SN, Hwang S, et al. Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean patients with drug-resistant tuberculosis. J Clin Microbiol, 2010, 48(2):402-411.
- [17] Siregel FA, Tait M, Warren RM, et al. Mutations in the *rrs A1401G* gene and phenotypic resistance to amikacin and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. Microb Drug Resist, 2012, 18(2):193-197.
- [18] Georghiou SB, Magana M, Garfein RS, et al. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin; a systematic review. PLoS One, 2012, 7(3):e33275.

(收稿日期:2012-11-21)

(本文编辑:张晓进)