

• 论著 •

对异烟肼与丙硫异烟胺耐药的结核分枝杆菌
临床分离株检测及相关基因突变的研究

刘银萍 王杰 张俊仙 梁艳 李洪敏 吴雪琼

【摘要】 目的 研究 MTB 对异烟肼(INH)和丙硫异烟胺(Pto)的耐药情况,及从临床标本中的 MTB 临床分离株直接检测 *katG* 和 *inhA* 基因型的价值。**方法** 回顾性调查解放军第三〇九医院全军结核病研究所 2014 年 8 月至 2015 年 8 月住院确诊,并经抗结核药物治疗有效的结核病患者,共 104 例。患者临床标本经培养鉴定为 MTB,然后通过绝对浓度法同时进行 INH 和 Pto 药物敏感性试验(简称“药敏试验”),并用基因芯片检测 MTB *katG* 和 *inhA* 基因型。**结果** 104 例患者的 MTB 临床分离株经绝对浓度法药敏试验检测显示:20 例(19.2%)对 INH 耐药,其中 3 例高度耐药、17 例低度耐药;5 例(4.8%)对 Pto 耐药,其中 1 例高度耐药、4 例低度耐药;INH 与 Pto 的交叉耐药率 20.0%(4/20)。以传统药敏试验为对照,20 例对 INH 耐药患者中,基因芯片检测 10 例(50.0%)发生 *katG* 基因 315 位点突变,3 例(15.0%)发生 *inhA* 基因-15 位点突变,1 例(5.0%)发生双基因突变;84 例 INH 敏感患者中,7 例(8.3%)发生 *katG* 基因 315 位点突变,5 例(6.0%)发生 *inhA* 基因-15 位点突变。基因芯片检测 *katG* 基因 315 位点突变预示 MTB 对 INH 耐药的敏感度为 55.0%(11/20),特异度为 91.7%(77/84);*inhA* 基因-15 位点突变预示 MTB 对 INH 和 Pto 耐药的敏感度分别为 20.0%(4/20)和 60.0%(3/5),特异度分别为 94.0%(79/84)和 93.9%(93/99)。**结论** 大多数结核患者的 MTB 临床分离株对 INH 和 Pto 耐药水平低,对 Pto 的耐药率低,*katG*315 和 *inhA*-15 基因突变与 MTB 对 INH 耐药密切相关,*inhA*-15 基因突变与 MTB 对 Pto 耐药密切相关,应用基因芯片可快速检测临床标本中 MTB 的 INH 和 Pto 耐药基因型。

【关键词】 分枝杆菌,结核; 异烟肼; 丙硫异烟胺; 抗药性,细菌; 芯片分析技术

A study on test and related genotypes of isoniazid-and-prothionamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical specimens LIU Yin-ping, WANG Jie, ZHANG Jun-xian, LIANG Yan, LI Hong-min, WU Xue-qiong. Army Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory, Beijing Key Laboratory of New Techniques of Tuberculosis Diagnosis and Treatment, Institute for Tuberculosis Research, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: WU Xue-qiong, Email: xueqiongwu@139.com

【Abstract】 Objective To investigate isoniazid (INH) and prothionamide (Pto) resistances in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), and to assess the value of direct detection of *katG* and *inhA* genotypes in MTB isolated from clinical specimens. **Methods** A total of 104 hospitalized TB patients undergoing effective anti-MTB treatment from Institute for Tuberculosis Research, the 309th Hospital of Chinese PLA between August 2014 and August 2015 were retrospectively studied. Clinical specimens were identified as MTB by culture media containing nitrobenzoic acid (PNB) and thiophene-carboxylic acid hydrazide (TCH) and INH and Pto drug susceptibility tests were performed at the same time by absolute concentration method. The mutations of MTB *katG* and *inhA* genes were detected using gene chip. **Results** Of the 104 clinical specimens, the results of drug susceptibility tests showed that 20 cases (19.2%) were INH-resistant, in which 3 cases were with high-level resistant, and 17 cases were with low-level resistant; 5 cases (4.8%) were Pto-resistant, including 1 case with high-level and 4 cases with low-level resistance. The cross-resistant rate between INH and Pto was 20.0% (4/20). Compared to conventional drug susceptibility test, when using gene chip in the 20 TB patients with INH resistance, 10 cases (50.0%) had *katG*315 mutations, 3 cases (15.0%) had *inhA*-15 mutations, and 1 case (5.0%) had the mutations at *katG*315 and

inhA—15. Of the 84 INH-sensitive TB patients, 7 cases (8.3%) had *katG*315 mutations, 5 cases (6.0%) had *inhA*—15 mutations. The sensitivity and specificity of *katG*315 mutations detection by gene chip for INH-resistance MTB were 55.0% (11/20) and 91.7% (77/84), respectively. The sensitivities of *inhA*—15 mutation for INH and Pto resistance were 20.0% (4/20) and 60.0% (3/5), respectively; and the specificities were 94.0% (79/84) and 93.9% (93/99), respectively. **Conclusion** Most MTB isolated from clinical specimens were at low level of INH and Pto resistance. The rate of Pto-resistant in MTB was also low. The *katG*315 and *inhA*—15 mutations were closely related with INH resistance, and the *inhA*—15 mutation was closely related with the Pto resistance. Using gene chip could rapidly detect the INH- and Pto-resistant genotypes of MTB in clinical specimens.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Isoniazid; Prothionamide; Drug resistance, bacterial; Micro-chip analytical procedures

异烟肼 (isoniazide, INH) 是一线抗结核药物, 是结核病标准化疗方案的重要组成药物。根据 2015 年世界卫生组织报告, 2014 年全球约有 48 万例耐多药结核病 (MDR-TB) 患者, 而我国约有 5.7 万例^[1]。由此可见, 制定有效的 MDR-TB 治疗方案对于控制结核病疫情至关重要。结核分枝杆菌 (MTB) 对 INH 耐药后, 临床上通常应用丙硫异烟胺 (protionamide, Pto) 来代替 INH 组成治疗方案^[2]。Pto 和乙硫异烟胺 (ethionamide, Eto) 均是异烟酸的衍生物, 两者与 INH 作用相似, 有一定的交叉耐药性^[3], 可通过抑制 MTB 分枝菌酸的合成而发挥抗结核作用^[4]。目前的研究已表明 MTB 耐 INH 主要与过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因 (*katG*) 和烯酰基运载蛋白还原酶的调控基因 (*inhA*) 突变有关^[5]。MTB 耐 Eto 主要是由于参与分枝菌酸合成的 *inhA* 编码基因和启动子区域突变所致^[6]。但目前尚未见 MTB 对 Pto 耐药与 *inhA* 相关性的研究报道。因此, 本研究将探讨 MTB 对 INH 与 Pto 的耐药情况, 并研究应用基因芯片从临床标本中直接检测 MTB *katG* 基因 315 位和 *inhA* 基因—15 位基因型的临床价值。

资料与方法

1. 一般资料: 对解放军第三〇九医院全军结核病研究所 2014 年 8 月至 2015 年 8 月住院确诊, 并经抗结核治疗有效的结核病患者进行回顾性调查。选择 104 例鉴定为 MTB 感染, 同时具有 INH、Pto 传统药物敏感性试验 (简称“药敏试验”) 和 INH 耐药基因芯片检测结果的患者作为研究对象。研究对象中, 78 例留取痰标本、10 例留取支气管灌洗液、10 例留取脓液、4 例留取胸腔积液、2 例留取病理组织。

2. 分枝杆菌培养鉴定: 按照《结核病诊断实验室检验规程》^[7], 应用含对硝基苯甲酸 (PNB) 和噻吩-2-羧酸肼 (TCH) 的 BACTEC 960 分枝杆菌培养系统进行分枝杆菌鉴别培养, 选择 PNB 阴性、TCH 阳

性生长物经抗酸染色证实后鉴定为 MTB 的患者。

3. 传统分枝杆菌药敏试验: 按照《结核病诊断实验室检验规程》^[7] 采用绝对浓度法进行传统的 MTB 药敏试验。以 MTB H37Rv 标准株作为质控菌株, 耐药判定标准: 高、低度耐 INH 浓度分别为 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$; 高、低度耐 Pto 浓度分别为 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 100 $\mu\text{g/ml}$ 。

4. 基因突变检测: 采用晶芯® MTB 耐药检测基因芯片 (购自博奥生物集团有限公司), 按照说明书提供的标准操作规程进行 PCR 扩增和芯片杂交。应用 MTB 耐药检测芯片判别系统进行芯片扫描和结果判读。

5. 统计学分析: 采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理。计算基因芯片检测法的敏感度和特异度; 计算各药物耐药发生率和交叉耐药率, 交叉耐药率 = 交叉耐药菌株数 / INH 耐药菌总株数 $\times 100\%$; 同一药物高度耐药和低度耐药发生率间的比较采用卡方检验或 Fisher 精确概率法检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况: 104 例确诊的结核病患者中, 40 例为肺结核, 29 例为肺结核并发结核性胸膜炎, 17 例为肺结核并发气管、支气管结核, 5 例为肺结核并发骨关节结核、5 例为骨关节结核, 3 例为肺结核并发淋巴结核, 2 例为肺结核并发结核性心包炎, 结核性胸膜炎、淋巴结核和肾结核各 1 例。男 69 例, 女 35 例, 平均年龄 (45.1 ± 19.5) 岁。

2. 耐药情况: 通过绝对浓度法同时对 104 例研究对象的临床样本进行 INH 和 Pto 药敏试验, 结果显示: 20 例 (发生率为 19.2%) 对 INH 耐药, 其中 3 例高度耐药 (发生率为 2.9%)、17 例低度耐药 (发生率为 16.3%), 低度耐药的发生率明显高于高度耐药 ($\chi^2 = 10.84$, $P = 0.000$); 5 例 (发生率为 4.8%) 对 Pto 耐药, 其中 1 例 (发生率为 1.0%) 高

度耐药、4 例(3.8%)低度耐药,低度耐药与高度耐药发生率的差异无统计学意义($P=0.150$);4 例 INH 与 Pto 交叉耐药,耐药率为 20.0%(4/20),见表 1。

3. 基因突变情况:应用基因芯片检测 104 例研究对象 MTB *katG* 基因 315 位点和 *inhA* 基因-15 位点突变情况,见表 2。以传统药敏试验为依据,20 例 INH 耐药患者中,基因芯片检测 10 例(50.0%)发生 *katG* 基因 315 位点突变,3 例(15.0%)发生 *inhA* 基因-15 位点突变,1 例(5.0%)发生双基因突变,则基因芯片检测 *katG* 基因 315 位点突变预示 INH 耐药的敏感度为 55.0%(11/20),*inhA* 基因-15 位点突变预示 INH 耐受的敏感度为 20.0%(4/20),两个耐药基因检测总的敏感度为 70.0%(14/20);84 例 INH 敏感患者中,7 例(8.3%)发生 *katG* 基因 315 位点突变,5 例(6.0%)发生 *inhA* 基因-15 位点突变,则基因芯片检测 *katG* 基因 315 位点突变的特异度为 91.7%(77/84),检测 *inhA* 基因-15 位突变的特异度为 94.0%(79/84),两个耐药基因检测总的特异度为 85.7%(72/84)。INH 耐药基因检测与传统药敏试验的一致率为 82.6%(86/104)。

5 例 Pto 耐药患者中,基因芯片检测只有 3 例发生 *inhA* 基因-15 位点突变,检测敏感度为 60.0%(3/5);99 例 Pto 敏感患者中,基因芯片检测 6 例(6.1%)发生 *inhA* 基因-15 位点突变,检测的特异度为 94.0%(93/99)。Pto *inhA* 耐药基因检测

与传统药敏试验的一致率为 92.3%(96/104)。

讨 论

根据 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告^[8],我国结核病患者对 INH 的耐药率最高(28.6%),对 Pto 的耐药率为 12.9%,均高于本研究的结果(分别为 23%、5%);也高于安徽省的 INH 耐药情况(20.0%),但 Pto 的耐药情况相同(12.9%)^[9]。李心德^[10]分析了 174 株 MDR-TB 对二线抗结核药的耐药情况,结果显示,Pto 的耐药率为 12.9%。本研究 Pto 的低耐药率可能系患者来源不同所致,也可能是表型药敏试验所用的商品化培养基的 Pto 耐药界限值较高,导致的假敏感。

INH 是在过氧化氢酶-过氧化物酶的作用下转化成活性型异烟酸而发挥抗结核作用的。研究已证明,MTB 的 *katG* 基因突变会导致过氧化氢酶-过氧化物酶活性丧失或活性降低,使 INH 不能转化为活性型而发生耐药^[4]。Seifert 等^[5]对 2000—2013 年来自 49 个国家的 118 篇关于 INH 耐药基因突变的研究进行系统综述,发现全球 INH 耐药菌株 64%与 *katG* 基因 315 位点突变相关,19%由 *inhA* 基因-15 位点突变所致。由于大多数 MTB 耐药发生于 *katG* 基因 315 位点和 *inhA* 基因-15 位点,这两个位点已成为 INH 耐药基因型检测的主要位点。本研究结果也证实了这两个位点的耐药基因型检测是可行的,并且以传统药敏试验结果为对照,其具有较高的敏感度、特异度和一致率。本研究发现 17 例

表 1 104 例研究对象异烟肼和丙硫异烟胺传统药敏试验结果

异烟肼	丙硫异烟胺			合计(例)
	敏感(例)	高度耐药(例)	低度耐药(例)	
敏感	83	1	0	84
高度耐药	2	0	1	3
低度耐药	14	0	3	17
合计	99	1	4	104

表 2 104 例研究对象基因芯片检测结果与传统药敏试验结果的比较

耐药基因型	异烟肼				丙硫异烟胺			
	敏感(例)	高度耐药(例)	低度耐药(例)	合计(例)	敏感(例)	高度耐药(例)	低度耐药(例)	合计(例)
野生型	72	0	6	78	77	1	0	78
突变型								
<i>katG</i> 315(G→C)	7	1	9	17	16	0	1	17
<i>inhA</i> -15(C→T)	5	1	2	8	5	0	3	8
<i>katG</i> 315(G→C)和 <i>inhA</i> -15(C→T)	0	1	0	1	1	0	0	1
合计	12	3	11	26	22	0	4	26

患者 *katG* 基因 315 位点突变,其中只有 1 例是高度耐药株,其余均为低度耐药株或敏感株。这是因为该位点突变只是导致过氧化氢酶-过氧化物酶活性降低,使 INH 转换为异烟酸的效率降低,临床加大剂量继续用药是有效的^[11]。

Pto 与 Eto 均为异烟酸的衍生物,因此,从原理上讲,*katG* 基因突变似乎与 Pto 和 Eto 无关。本研究中 Pto 耐药株中仅见 1 例 *katG* 基因突变;Morlock 等^[12]未发现 *katG* 基因突变与 Eto 耐药相关。但 Pto、Eto 与 INH 转化后的活性物质作用相似,可抑制 MTB 分枝菌酸的合成。虽然本研究检测 Pto 的耐药株较少,但以传统药敏试验为对照,基因型检测具有较高的特异度和一致率,也初步提示 Pto 耐药可能与 *inhA* 基因-15 位点突变密切相关。针对此结论,笔者将扩大样本量进一步研究证实。这一结果也预示 INH 与 Pto 和 Eto 之间存在一定的交叉耐药率。本研究中,*inhA* 基因-15 位点突变在 INH 耐药株中所占比例较小,且主要表现为低度耐药;传统药敏试验结果显示,INH 与 Pto 的交叉耐药率也只有 20.0%;3 例 INH 高度耐药的患 Pto 表现为敏感或低度耐药。由此提示,INH 耐药尤其是无 *inhA* 基因突变患者可选择 Pto 或 Eto 代替 INH 进行治疗^[2]。

综上所述,本研究大多数标本中 MTB 对 INH 和 Pto 耐药水平低,对 Pto 的耐药率低,提示临床上可应用 Pto 代替耐药的 INH 用于结核病治疗;*katG* 基因 315 位点和 *inhA* 基因-15 位点突变与 INH 耐药密切相关,*inhA* 基因-15 位点突变与 Pto 耐药密切相关,应用基因芯片快速检测临床标本中 MTB 的 INH 和 Pto 耐药基因型,可指导临床合理用药。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015 [R/OL]. (2015-11-16)[2016-06-07]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- [2] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2015). 中国防痨杂志, 2015, 37(5): 421-469.
- [3] Schaaf HS, Victor TC, Venter A, et al. Ethionamide cross- and co-resistance in children with isoniazid-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(11): 1355-1359.
- [4] Vilchèze C, Jacobs WR Jr. Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities. *Microbiol Spectr*, 2014, 2(4): MGM2-0014-2013.
- [5] Seifert M, Catanzaro D, Catanzaro A, et al. Genetic mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119628.
- [6] Machado D, Perdigão J, Ramos J, et al. High-level resistance to isoniazid and ethionamide in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* of the Lisboa family is associated with *inhA* double mutations. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(8): 1728-1732.
- [7] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 55-57.
- [8] 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.
- [9] 徐东芳, 王庆, 李擎, 等. 安徽省 420 株结核分枝杆菌对一线和二线抗结核药物药敏结果分析. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(1): 54-57.
- [10] 李心德. 174 株耐多药结核分枝杆菌对二线抗结核药耐药情况分析. 国际检验医学杂志, 2014, 35(13): 1732-1733, 1748.
- [11] Katiyar SK, Bihari S, Prakash S, et al. A randomised controlled trial of high-dose isoniazid adjuvant therapy for multi-drug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12(2): 139-145.
- [12] Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(12): 3799-3805.

(收稿日期: 2016-06-08)

(本文编辑: 李敬文)