

• 论著 •

结核分枝杆菌 *rpsL* 和 *rrs* 基因突变与氨基糖苷类和多肽类抗结核药物耐药的关系

宋艳华 高孟秋 李琦 马丽萍 陆宇 刘荣梅 付育红 陈红梅

【摘要】 目的 测定结核分枝杆菌(MTB)临床分离株对链霉素(Sm)、卡那霉素(Km)、阿米卡星(Am)、卷曲霉素(Cm)的敏感性,了解其耐药程度和交叉耐药水平,并进一步探讨耐药及交叉耐药与 MTB 的 *rrs* 和 *rpsL* 基因突变的关系。**方法** 采用微量平板 Alamar Blue 检测(MABA)法,检测 64 株选自北京胸科医院的 MTB 临床分离菌株的 Sm、Km、Am 和 Cm 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值;并且对这些菌株 *rrs* 和 *rpsL* 基因进行序列测定。**结果** 64 株 MTB 临床分离株中,52 株对 Sm 耐药,其中有 42 株(80.8%)发生 *rpsL* 基因突变,包括 32 株(76.2%)为 128A→G(Lys43Arg),其 MIC 值均≥128 μg/ml;9 株(21.4%)263A→G(Lys88Arg),1 株(2.4%)263A→T(Lys88Met),MIC 值介于 4~64 μg/ml。9 株菌 *rrs* 基因 514A→C 突变,其中,8 株 MIC 值介于 4~8 μg/ml,1 株 MIC 值为 2 μg/ml。在 2 株 Sm 耐药株(MIC 值是 4 μg/ml)中没有发现 *rpsL* 基因、*rrs* 基因 530 区及 *rrs* 基因 1400 区突变。18 株菌检测到 *rrs* 基因 1401A→G 突变,均对 Km 和 Am 高度耐药。其中,15 株为 *rrs* 基因 1401A→G 单突变,3 株合并 *rrs* 基因其他位点突变。18 株菌对 Sm、Km、Am 均耐药,且对 Km 和 Am 均高度耐药。18 株 *rrs* 基因 1401A→G 突变菌株中,13 株菌对 Km、Am、Cm 均耐药,且均为 Km、Am 高度耐药耐合并 Cm 低度耐药;5 株菌对 Cm 敏感(MIC 值均为 2.5 μg/ml)。64 株菌株均有 *rpsL* 基因 363A→G 突变,相应的密码子为 121 位 AAA→AAG 突变,其编码的氨基酸均为赖氨酸(Lys)。**结论** MTB 的 *rpsL* 基因 Lys43Arg、Lys88Arg/Met 突变分别可能与 Sm 高度和中度耐药相关;*rrs* 基因 514A→C 突变可能与 Sm 低度耐药相关。*rrs* 基因 1401A→G 联合 514A→C 突变,或联合 *rpsL* 基因突变可能与 Sm、Km、Am 均耐药相关。*rrs* 基因 1401A→G 是 Km 高度耐药及交叉耐药的分子基础,也可能是 Km 和 Am 与 Cm 部分交叉耐药的分子基础。

【关键词】 分枝杆菌,结核; 抗药性,细菌; 氨基糖苷类; 肽类; 抗生素类,抗结核; 基因,MDR

Relationship between drug-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to aminoglycoside and polypeptide and gene mutations of *rpsL* and *rrs* SONG Yan-hua, GAO Meng-qiu, LI Qi, MA Li-ping, LU Yu, LIU Rong-mei, FU Yu-hong, CHEN Hong-mei. Department of Tuberculosis, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

Corresponding author: GAO Meng-qiu, Email: gaomqwmdm@aliyun.com

【Abstract】 Objective To observe the drug resistance and cross-resistance of streptomycin (Sm), kanamycin (Km), amikacin (Am), capreomycin (Cm) for *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) clinical isolates by drug susceptibility testing (DST), and to investigate the association of mutation in MTB gene *rpsL* and *rrs* and the resistance and cross-resistance of these drugs. **Methods** The liquid dilution method Microdilution alamar blue assay (MABA) was performed to detect minimum inhibitory concentrations (MICs) of Sm, Km, Am, Cm of 64 MTB clinical isolates obtained from Beijing Chest Hospital. Gene *rrs* and *rpsL* of 64 MTB clinical isolates were sequenced to analyze the relationship of the mutation in gene *rrs* and *rpsL* and the resistance and cross-resistance of Sm, Km, Am, Cm. **Results** Of the 64 isolates, 52 isolates were resistant to Sm, mutation in codon 43 or 88 of *rpsL* gene were observed in 42 (80.8%) isolates, including 32 isolates (76.2%) with mutation in codon 43 (Lys43Arg) with Sm MIC≥128 μg/ml, 9 isolates (21.4%) with mutation in *rpsL* 263A→G (Lys88Arg) and 1 isolate (2.4%) with mutation in *rpsL* 263A→T (Lys88Met), the Sm MICs of these isolates were 4~64 μg/ml. Gene *rrs* 514A→C were observed in 9 isolates, the MICs of Sm were 4~8 μg/ml in 8 isolates and 2 μg/ml in 1 isolate. Gene *rrs* 1401A→G mutation were observed in 18 isolates which were high-level resistant to both Km and Am, 15 isolates were observed only in

Gene *rrs* 1401A→G mutation, and 3 isolates were combined with other mutation. All these isolates were resistant to Sm, Km, Am three drugs, and were high-level resistant to Km and Am. Of 18 isolates with gene mutation in *rrs* 1401A→G, 13 isolates were high-level resistant to Km and Am, and low-level resistant to Cm, 5 isolates were susceptible to Cm (MIC 2.5 $\mu\text{g/ml}$). All these 64 isolates were observed 363A→G mutation in gene *rpsL*, with codon AAA→AAG, they all encode Lys. **Conclusion** Mutation in codon 43 of *rpsL* (Lys43Arg) and codon 88 (Lys88Arg/Met) of MTB was likely associated with high-level and moderate-level resistance to Sm, mutation in *rrs* 514 A→C was likely associated with low-level resistance to Sm. Combination of mutations in gene *rrs* 1401A→G and gene *rpsL*, *rrs* 514 may be the molecular mechanism of resistant to Sm, Km and Am. Mutation in *rrs* 1401A→G were the molecular basis of cross resistance between Km and Am, maybe also the molecular basis of partly cross resistance between Km/Am and Cm.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance, bacterial; Aminoglycosides; Peptides; Antibiotics, antitubercular; Genes, MDR

氨基糖苷类和多肽类抗结核药是较早用于治疗结核病的药物。近些年,MDR-TB 流行和抗结核新药匮乏,氨基糖苷类[卡那霉素(Km),阿米卡星(Am)]和多肽类药物[卷曲霉素(Cm)]作为注射用抗结核药物是组成 MDR-TB 治疗方案的核心药物。用于抗结核治疗的氨基糖苷类药物[链霉素(Sm)、Km、Am]和多肽类药物(Cm)的抗菌机制相似,其作用靶点有重叠,这导致了这些药物的交叉耐药性。已有研究报道 16S rRNA 及 S12 核糖体蛋白的编码基因 *rrs* 和 *rpsL* 突变会导致 Sm 耐药,且 *rpsL* 基因的 Lys43Arg 及 Lys88Arg 突变是 Sm 耐药的主要原因。而 *rrs* 的 A1401G 突变与 Km、Am 耐药及其与 Cm 交叉耐药相关。但是对于 Sm 和 Am、Km、Cm 的交叉耐药的分子机制,不同研究仍有差异。笔者通过检测 *rpsL* 和 *rrs* 基因序列,对耐药表型和基因型的相关性进行分析探索。

材料和方法

1. 临床菌株:64 株临床 MTB 菌株选自北京胸科医院临床菌株库,菌株均经罗氏培养阳性,且经硝基苯甲酸(PNB)、噻吩-2-羧酸肼(TCH)菌种鉴定确认。采用 MABA(微孔板 Alamar Blue)进行药物 Sm、Km、Am、Cm 等的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)检测^[1]。实验菌株包括 Sm 耐药合并 Km 和(或)Am 耐药株 24 株,Sm 耐药而 Km 和 Am 敏感株 28 株,对 Sm、Km、Am 均敏感菌株 12 株。H37Rv 标准株(ATCC27294)由北京市结核病胸部肿瘤研究所药物研究室提供。

2. 实验药物:Sm(批号:638K0813)、Km(批号:109K0147)、Am(批号:048K1289)、Cm(批号:018K1068)均购自美国 Sigma 公司。

3. 主要实验设备:生物安全柜(新加坡 ESCO, LA2-6A1);压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂, HHS 型);电子天平(北京塞多利斯

仪器系统有限公司,京利 00000249);超低温冰箱(日本 SANYO, MDF-U4186F);低温冰箱(青岛海尔股份有限公司,BCD2007ADz);涡旋振荡器(美国 Scientific industries, G560E Vortex-2,)。PCR 仪(杭州博日科技有限公司, GenePro 基因扩增仪 B96G);电泳仪(北京市六一仪器厂, DDY-6C 型);全自动凝胶成像系统(上海天能科技有限公司, tanon 4200)。

4. 菌株 DNA 提取:MTB 菌株培养、菌悬液制备及 MIC 测定参照文献[1]。采用 TE 缓冲液煮沸法,从 7H11 培养基上刮去 MTB,置于 1.5 ml 尖底 EP 管中,加入 TE 200 μl ,混匀,在煮沸(100 $^{\circ}\text{C}$)的水浴锅中水浴 20 min,取出后 4 $^{\circ}\text{C}$ 6000 $\times g$ 离心 5 min,取出后吸取上清液至洁净的 1.5 ml EP 管中,置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

5. PCR 反应:(1)引物合成:从 GenBank 中检索 MTB H37Rv 菌株 *rpsL* 和 *rrs* 基因全基因组序列,*rrs* 基因在 H37Rv 菌株全基因组的 1471846~1473382 位,长度为 1537 bp;*rpsL* 基因在 H37Rv 菌株全基因组的 781650~781934,长度为 375 bp。应用 Primer premier 5.0 软件进行设计,引物序列见表 1。引物由北京赛百盛生物技术有限公司合成。(2)PCR 扩增:反应体积为 50 μl ,体系中上、下游引物各 1 μl (浓度 10 $\mu\text{mol/L}$),2 \times Taq PCR Master-Mix 25 μl ,DNA 模板 2 μl ,双蒸水(ddH₂O) 21 μl 。反应参数:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,退火 30 s,63 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,循环 50 次;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,反应停止后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(3)产物电泳检测:PCR 停止后,每个样品中取出 10 μl ,加入 1 μl 的 10 \times Loading 缓冲液,混匀,取 5 μl 混合液样品,并加入梯度为 100 bp 的 DNA Marker 标记,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 90 V。应用凝胶成像系统紫外线检测相应条带。

表 1 PCR 反应引物序列及其扩增片段

基因	引物(5'~3')	产物长度	扩增区域
<i>rpsL</i>	F:GCCGACAAACAGAACGTGAA	490 bp	上游 45 bp~下游 70 bp
	R:GTGACCAACTGCGATCCGTA		
	测序引物:GTGACCAACTGCGATCCGTA		
<i>rrs</i>	F1:TGGCCGTTTGTGTTTGTGTCAGG	694 bp	上游 67~627 bp
	R1:CCGCACGCTCACAGTTAAG		
	测序引物:TGGCCGTTTGTGTTTGTGTCAGG	651 bp	506~1156 bp
	F2:GTGCCAGCAGCCGCGGTAAT		
	R2:CCGGCAGTCTCTCACGAGT	572 bp	1063 bp~下游 98 bp
	测序引物:GTGCCAGCAGCCGCGGTAAT		
	F3:TGTCGTGAGATGTTGGGTTA		
	R3:GCCAACTTTGTTGTCATGC		
	测序引物:GCCAACTTTGTTGTCATGC		

注 F:表示正向;R:表示反向

6. DNA 测序及分析:PCR 产物送华大基因科技股份有限公司,进行提纯后采用 ABI 公司的 3730XL 测序仪进行测序。测序结果经 DNASTar 软件、Chromas V2.22 进行比对分析。实验数据采用 SPSS 13.0 分析。

结 果

1. 基本情况:成功将 64 株菌的 DNA 提取并且对 *rpsL* 和 *rrs* 基因进行扩增并测序。64 株菌对 4 种抗结核药物(Sm、Km、Am、Cm)的 MIC 值及基因测序结果见表 2。

2. 基因突变与 Sm 耐药的关系:共有 52 株菌对 Sm 耐药。其中,42 株(80.8%)*rpsL* 基因 43 位或 88 位密码子突变,8 株(15.4%)具有 *rrs* 基因 514 位点突变,2 株(3.9%)没有发现以上突变。42 株 *rpsL* 基因突变菌中,包括 32 株(76.2%)为 128A→G(Lys43Arg),其 MIC 值均 ≥ 128 μg/ml;9 株(21.4%)263A→G(Lys88Arg),1 株(2.4%)263A→T(Lys88Met),MIC 值介于 4~64 μg/ml。Sm 耐药株中 9 株(17.3%)*rrs* 基因 514A→C 突变,其中,8 株 MIC 值介于 4~8 μg/ml,1 株 MIC 值为 2 μg/ml。在 2 株(3.9%)Sm 耐药株(MIC 值是 4 μg/ml)中没有发现 *rpsL* 基因、*rrs* 基因 530 区及 *rrs* 基因 1400 区突变。12 株菌对 Sm 敏感,其中,除 1 株有 *rrs* 基因 514A→C 突变,其余 11 菌株均没有 *rpsL* 基因和 *rrs* 基因 530 区及 1400 区突变。没有发现敏感株中有 *rpsL* 基因的突变(表 2)。

3. *rrs* 基因突变与 Km、Am 耐药关系:23 株

Km 耐药株和 19 株 Am 耐药株中均有 18 株菌(分别占 Km、Am 耐药株的 78.3%、94.7%),这些菌株同时对 Km 和 Am 高度耐药并且均检测到 *rrs* 基因 1401A→G 突变。其中 15 株为 *rrs* 基因 1401A→G 单突变,3 株合并 *rrs* 基因其他位点突变(表 2)。5 株 Km 低度耐药 Am 敏感菌,1 株 Am 低度耐药 Km 敏感菌,以及 40 株菌 Km、Am 均敏感菌株中都没有发现 *rrs* 基因 1401 突变。7 株 *rrs* 基因 514A→C 突变不联合 1401A→G 突变的菌株对 Km 和 Am 均敏感。

4. Sm 联合 Km、Am 耐药菌株的基因突变情况:18 株菌对 Sm、Km、Am 三药同时耐药,且对 Km 和 Am 均高度耐药。基因突变模式为:(1)*rpsL* 基因 128A→G + *rrs* 基因 1401A→G 突变 13 株;(2)*rpsL* 基因 263A→G + *rrs* 基因 1401A→G 突变 2 株;(3)*rpsL* 基因无突变 + *rrs* 基因 1401A→G、514A→C 突变 1 株;(4)*rpsL* 基因无突变 + *rrs* 基因 514A→C、1401A→G、1176G→A 突变 1 株;(5)*rrs* 基因 263A→T + *rrs* 基因 1401A→G、10G→A 突变 1 株。

5. Km、Am、Cm 同时耐药菌株的基因突变情况:18 株 *rrs* 基因 1401A→G 突变菌株中,13 株(72.2%)菌对 Km、Am、Cm 均耐药,且均为 Km、Am 高度耐药耐合并 Cm 低度耐药;5 株(27.8%)对 Cm 敏感(MIC 值均为 2.5 μg/ml)。13 株菌耐 Cm,其中在 Km 和 Am 均敏感的菌株中,只有 1 株对 Cm 耐药(MIC 值为 5 μg/ml),该菌株不具有 *rrs* 和 *rpsL* 突变。

表 2 *rpsL* 和 *rrs* 基因各突变类型菌株数及对应的抗结核药物最小抑菌浓度值

突变类型		菌株数	最小抑菌浓度(μg/ml)			
<i>rpsL</i> 基因	<i>rrs</i> 基因		Sm	Km	Am	Cm
128A→G (AAG→AGG, Lys43Arg)	1401A→G	1	≥128.00	>128.00	>128.00	20.00
128A→G (AAG→AGG, Lys43Arg)	1401A→G	7	≥128.00	>128.00	>128.00	5.00
128A→G (AAG→AGG, Lys43Arg)	1401A→G	5	≥128.00	>128.00	>128.00	2.50
263A→G (AAG→AGG, Lys88Arg)	1401A→G	1	64.00	>128.00	>128.00	5.00
263A→G (AAG→AGG, Lys88Arg)	1401A→G	1	32.00	>128.00	>128.00	5.00
263A→T (AAG→ATG, Lys88Met)	1401A→G, 10G→A	1	4.00	>128.00	>128.00	5.00
无突变	1401A→G, 514A→C	1	8.00	>128.00	>128.00	5.00
无突变	1176G→A, 1401A→G, 514A→C	1	8.00	>128.00	>128.00	5.00
263A→G (AAG→AGG, Lys88Arg)	无突变	2	16.00	1.00~2.00	0.50~1.00	1.25~2.50
263A→G (AAG→AGG, Lys88Arg)	无突变	1	8.00	4.00	0.50	1.25
263A→G (AAG→AGG, Lys88Arg)	无突变	4	8.00	1.00	0.50	1.25~2.50
无突变	514A→C	1	8.00	1.00	0.50	1.25
无突变	514A→C, 15T→G	1	8.00	0.50	0.25	1.25
无突变	514A→C, 278A→G	2	4.00	0.50~1.00	0.25~0.50	1.25
无突变	514A→C	2	4.00	0.50~1.00	0.25~0.50	1.25
无突变	无突变	2	4.00	0.50~2.00	0.25~0.50	1.25~2.50
无突变	无突变	2	2.00	2.00~4.00	0.50~1.00	2.50~5.00
无突变	514A→C	1	2.00	1.00	0.50	1.25
无突变	无突变	1	1.00	2.00	0.50	2.50
无突变	207A→G	1	≤1.00	≤2.00	≤1.00	≤2.50
无突变	无突变	7	≤1.00	≤2.00	≤1.00	≤2.50
128A→G (AAG→AGG, Lys43Arg)	无突变	1	≥128.00	4.00	4.00	1.25
128A→G (AAG→AGG, Lys43Arg)	无突变	5	≥128.00	8.00	≤1.00	≤2.50
128A→G (AAG→AGG, Lys43Arg)	无突变	13	≥128.00	≤2.00	≤1.00	≤2.50

注 Sm、Km、Am、Cm 的最小抑菌浓度值经 MABA 法测得。据参考文献[2-3]设定 Sm、Km、Am、Cm 的临界浓度分别为 2.0、4.0、1.0、2.5 μg/ml。根据 Sm、Km、Am 耐药株的 MIC 值分为 ≤16 μg/ml、32~64 μg/ml、>64 μg/ml 分别定义为低度耐药、中度耐药、高度耐药；根据 Cm 耐药株的 MIC 值分为 ≤20 μg/ml、40~80 μg/ml、>80 μg/ml 分别定义为低度耐药、中度耐药、高度耐药。

6. 与 Sm、Km、Am、Cm 耐药不相关的基因突变: 64 株菌株均有 *rpsL* 基因 363A→G 突变, 相应的密码子为 121 位 AAA→AAG 突变, 其编码的氨基酸均为赖氨酸(Lys)。另外发现 5 个突变位点,

即 *rrs* 基因 10G→A(1 株)、15T→G(1 株)、207A→G(1 株)、278A→G(1 株)、1176G→A(1 株); 其中, *rrs* 基因 207A→G 突变株对 Sm、Km、Am、Cm 均敏感; 其余 4 株以不同形式对 Sm、Km、Am、Cm 耐药,

但是这 4 株菌均合并 *rrs* 或 *rpsL* 基因的其他突变(表 2)。

讨 论

抗结核注射剂氨基糖苷类和多肽类药物是一组重要的抗结核药物,但是这组药物之间存在交叉耐药现象,困扰临床医生对抗结核方案的选择。了解 MTB 菌株对这组药物的分子耐药机制和交叉耐药机制,将有助于为耐药的快速诊断提供依据,同时指导临床合理用药。

MTB 对链霉素耐药机制与 MTB 核糖体蛋白 S12 的编码基因 *rpsL* 和(或)16S rRNA 编码基因 *rrs* 突变相关^[4]。*rpsL* 基因突变是 MTB 对 Sm 耐药的主要机制,约占 Sm 耐药株的 52%~59%^[5]。最常见的突变是编码第 43 位氨基酸密码子中的碱基 A→G 的突变(Lys43Arg);其次是 88 位氨基酸密码子突变。本研究显示,80.8%的 Sm 耐药株具有 *rpsL* 基因突变(Lys43Arg 和 Lys88Arg/Met 两个位置突变),且以 *rpsL* 基因 Lys43Arg 突变为主,敏感株中没有发现 *rpsL* 基因的突变。*rrs* 基因 514 A→C 突变可能与 Sm 低度耐药相关。Tudo 等^[6]报道,*rpsL* 基因突变(Lys43Arg, Lys88Arg/Thr/Gln)中 *rpsL* 第 43 为密码子突变株的 MIC 值均大于 512 μg/ml,第 88 位密码子突变株的 MIC 值为 32~512 μg/ml;*rrs* 基因突变株(514A→T/C, 517C→T)的 MIC 值为 16~512 μg/ml。Fukuda 等^[7]研究也发现 Sm 耐药株中高度耐药株占多数,*rpsL* 第 88 密码子突变株的 MIC 值略低于第 43 位密码子突变株的水平。本研究的结果 *rpsL* 基因 Lys43Arg 突变株的 MIC 值显示其对 Sm 高度耐药(MIC 值≥128 μg/ml),与上述研究结果一致;*rrs* 基因 514A→C 突变可能与其对 Sm 低度耐药相关;但是 *rpsL* 基因 Lys88Arg/Met 突变株的 MIC 值低于上述研究的平均水平,考虑可能与菌株地域性差异有关,也可能与不同的药物敏感性试验方法有关。虽然其他研究中曾报道 Sm 耐药株中具有 *rpsL* 基因 Lys43Thr 或 Lys88Thr 突变,及 *rrs* 基因 517、492、905 等位点突变^[4,6,8],但是本研究中没有发现具有这几种突变的菌株,也没发现出现 *rpsL* 基因第 43 和 88 位密码子双突变或 *rpsL* 和 *rrs* 基因 530 区双突变的菌株,并且这几种突变在其他报道中,尤其在我国的报道中出现的频率也较低^[8-10]。

Km 和 Am 主要通过和细菌核糖体 16S rRNA 结合而发挥作用。研究显示,其耐药与 16S rRNA

编码基因 *rrs* 的 1400 区突变相关^[11-12]。用检测 *rrs* 基因 1401A→G 突变的方法来测定 MTB 临床株的 Km 和 Am 耐药,其特异度达到 100%,敏感度分别达到 85.9% 和 92.4%^[11,13-14]。本研究中,18 株 Km、Am 耐药株对 Km 和 Am 均高度耐药,均有 *rrs* 基因 1401A→G 突变,这与其他的研究一致^[11-13,15]。*rrs* 基因第 1401 位碱基突变可以作为检测 Am、Km 高度耐药的分子标识。Km 和 Am 与多肽类药物 Cm 之间有着相同的作用机制,易产生完全或部分交叉耐药,这 3 种药物交叉耐药的机制主要与 *rrs* 基因 1401A→G 突变相关。研究发现,通过体外用 Am 可从敏感株中筛选出突变的 Km、Am 和 Cm 耐药菌株,这种菌株具有 *rrs* 基因 1401A→G 突变,对 Km、Am 高度耐药,对 Cm 低度耐药;在对 Km 和 Am 高度耐药(MIC 值>128 μg/ml)而 Cm 敏感或低度耐药的临床分离株中在也检测到了这种基因型^[11-12,15]。本研究中,*rrs* 基因 1401A→G 突变的菌株对 Am 和 Km 均高度耐药,其中 Cm 的 MIC 值为 2.5~20 μg/ml,只有 72.22%是 Cm 耐药,而且其 MIC 值也偏低(5~20 μg/ml),没有发现对 Cm 高度耐药的菌株。MTB 临床株中 *rrs* 基因 1401A→G 可能是 Km 和 Am 与 Cm 耐药的部分机制,检测到此突变的 MTB 临床株对 Km 和 Am 高度耐药,其大部分对 Cm 低度耐药,但仍有一小部分对 Cm 敏感。所以一部分对 Km 和 Am 高度耐药的 MTB 菌感染者,可考虑用 Cm 组成对其有效的抗结核方案。

之前认为,从 Sm 到 Km 或 Am 是单向耐药,对于考虑 Km 和 Am 耐药菌株感染者,不再主张应用 Sm 治疗。研究显示,Km、Am 耐药 MTB 含有 *rrs* 基因 517C→T 和 514A→C 突变^[13-14],该突变可能导致 Sm 与 Km、Am 交叉耐药。但 Via 等^[16]对临床株检测显示,具有 514A→C 突变的菌株对 Sm 耐药但对 Km 和 Am 敏感。Wong 等^[17]研究显示,具有 *rrs* 基因 1401A→G 突变的 Km 耐药株可能对 Sm 敏感。本研究中,对 Sm、Km、Am 均耐药的 18 株菌株,都具有与 Km、Am 高度耐药相关基因 *rrs* 基因 1401A→G 突变,同时合并 Sm 耐药相关的 *rpsL* 或 *rrs* 基因 514 A→C 突变。本研究也发现,9 株具有 *rrs* 基因 514A→C 突变的菌株中,7 株均对 Am 和 Km 敏感;4 株对 Am 和 Km 高度耐药(MIC 值≥128 μg/ml)对 Sm 是低中度耐药(MIC 值 4~64 μg/ml)。所以,笔者认为 *rrs* 基因 1401A→G 联合 514A→C 突变,或联合 *rpsL* 基因突变可能与 Sm、Km、Am 均耐药相关。另外,有研究报道,*rrs*

基因 1402G→T、1484G→T 与 Km、Am、Cm 交叉耐药相关^[12,18], 本研究中没有发现这种基因型。

本研究中还发现了 *rrs* 基因 10G→A、15T→G、207A→G、278A→G、1176G→A 突变, 可能和 4 种注射剂的耐药性没有明显关联, 且在 MTB 耐药相关基因突变和多态性数据库 (www. tbdreamdb. com) 中检索, 未见记录。所有的耐药菌株和敏感菌株都有 *rpsL* 基因 363A→G 突变, 检索 TBDB 数据库 (www. tbdb. org) 显示 *rpsL* 基因第 121 位 AAA→AAG 为多态性改变, 对药物敏感性无影响。

总之, 本研究显示, MTB 的 *rpsL* 基因 Lys43Arg、Lys88Arg/Met 突变分别可能与 Sm 的高度和中度耐药相关; *rrs* 基因 514A→C 突变可能与 Sm 低度耐药相关。 *rrs* 基因 1401A→G 联合 514A→C 突变, 或联合 *rpsL* 基因突变可能与 Sm、Km、Am 均耐药相关。 *rrs* 基因 1401A→G 是 Km 高度耐药及交叉耐药的分子基础, 也可能是 Km 和 Am 与 Cm 部分交叉耐药的分子基础。但由于条件限制本研究样本量较少, 没有能够涵盖较多的耐药表型和基因型, 研究结果可能有一定的偏倚和局限性, 进一步加大样本检测及进行其他机制的研究, 将有助于解决 MTB 耐药的机制问题。

参 考 文 献

- [1] 宋艳华, 马丽萍, 陆宇, 等. 117 株结核分枝杆菌临床分离株对注射用抗结核药物耐药水平的研究. 中国防痨杂志, 2015, 37(4): 371-376.
- [2] Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41 (5): 1004-1009.
- [3] World Health Organization. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. Geneva: World Health Organization, 2008.
- [4] Shi R, Zhang J, Li C, et al. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by denaturing HPLC analysis and DNA sequencing. Microbes Infect, 2007, 9(14/15): 1538-1544.
- [5] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015. Int J Tuberc Lung Dis, 2015, 19(11): 1276-1289.
- [6] Tudó G, Rey E, Borrell S, et al. Characterization of mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the area of Barcelona. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(11): 2341-2346.
- [7] Fukuda M, Koga H, Ohno H, et al. Relationship between genetic alteration of the *rpsL* gene and streptomycin susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. J Antimicrob Chemother, 1999, 43(2): 281-284.
- [8] 贾琼, 石大伟, 赵玉玲, 等. 河南省耐多药结核分枝杆菌链霉素耐药相关基因 *rpsL* 和 *rrs* 突变分析. 中国防痨杂志, 2010, 32(11): 760-762.
- [9] 桂静, 王峰, 罗道泉, 等. 深圳地区结核分枝杆菌耐药及广泛耐药分离株的分子特征. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 33(4): 276-279.
- [10] Li GL, Zhao DF, Xie T, et al. Molecular characterization of drug-resistant Beijing family isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Tianjin, China. Biomed Environ Sci, 2010, 23(3): 188-193.
- [11] 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.
- [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] 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.
- [14] Sugawara I, Zhang J, Li C. Cross-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates among streptomycin, kanamycin and amikacin. Indian J Exp Biol, 2009, 47(6): 520-522.
- [15] Engström A, Perskvist N, Werngren J, et al. Comparison of clinical isolates and in vitro selected mutants reveals that *tlyA* is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother, 2011, 66 (6): 1247-1254.
- [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] Wong SY, Lee JS, Kwak HK, et al. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 2515-2522.
- [18] Sirgel 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.

(收稿日期: 2016-04-16)

(本文编辑: 李敬文)