

结核分枝杆菌耐药检测及其临床意义

阳幼荣, 吴雪琼*

(解放军第三〇九医院 全军结核病研究所 全军结核病防治重点实验室 结核病诊疗新技术北京市重点实验室, 北京 100091)

【摘要】 耐药结核病(TB)尤其是耐多药结核病(MDR-TB)、广泛耐药结核病(XDR-TB)的快速诊断和有效治疗是TB防控中亟需解决的难题。结核分枝杆菌(Mtb)耐药的主要机制是由于药物作用靶标或药物代谢酶编码基因突变所致。临床上常用的Mtb药物敏感性试验方法主要包括表型药敏方法和分子药敏方法, 本文还简要地概述了通过药敏试验所揭示的一些值得临床医师关注的临床意义。

【关键词】 结核分枝杆菌; 药物敏感性试验; 耐药; 耐药基因

【中图分类号】 R52; R969.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2018)04-0018-05

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2018.04.005

Drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis* and its clinical significance

YANG You-rong, 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)

【Abstract】 The rapid diagnosis and effective treatment of drug-resistant tuberculosis (TB), especially multi-drug resistant TB (MDR-TB) and extensively drug resistant TB (XDR-TB), are key problems that need be solved in the prevention and control of TB. The main mechanism of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is due to the mutations of the genes encoding the drug action targets or the drug metabolizing enzyme. Mtb drug susceptibility test methods mainly included phenotypic drug susceptibility testing and molecular drug sensitivity testing. This article also briefly outlines the clinical significance of drug sensitivity tests that deserve attention by the clinicians.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; drug susceptibility test; drug resistance; drug resistance-related genes

结核病(TB)是全球及我国严重的公共卫生问题, TB耐药情况也相当严重, 根据世界卫生组织报道, 2016年全球新发TB患者1 040万, 130万人死于TB; 60万新发TB患者耐利福平(RR-TB), 其中49万是耐多药结核病(MDR-TB)患者, MDR/RR-TB在新发TB患者中的发生率约4.1%, 在已治疗患者中约19%; MDR-TB患者中XDR-TB占6.2%。耐药TB病例47%发生于印度、中国和俄罗斯。2016年我国新发TB患者89.5万, MDR/RR-TB发生率是5.2%^[1]。因此, 耐药TB尤其是MDR-TB、广泛耐药结核病(XDR-TB)的快速诊断和有效治疗是TB防控中亟需解决的难题。

本文简要地概述结核分枝杆菌(Mtb)耐药机制、当前我国临床上常用的Mtb药物敏感性试验(drug susceptibility testing, DST)方法及其临床意义。

1 Mtb 耐药机制

Mtb耐药机制尚未完全研究清楚, 但已发现下列机制; ①药物作用靶标或药物代谢酶改变: 这是大多数Mtb耐药的分子机制; ②药物外排泵(EPs): EPs过表达导致活性增高或EP基因的转录调节子表达激活均会导致Mtb耐药; ③细胞壁渗透性改变或细胞壁缺陷如L型也可能是耐药产生的原因; ④双组分系统(TCS): 可能通过调控EPs或细胞壁

[收稿日期] 2018-03-25

[作者简介] 阳幼荣, 男, 主管技师; 研究方向: 结核病基础研究; Tel: (010)66775675; E-mail: yangyurong@163.com

[通讯作者] *吴雪琼, 女, 博士生导师; 研究方向: 结核病基础和临床研究; Tel: (010)66775109; Email: xueqiongwu@139.com

渗透性而导致耐药^[2]。下面简介常见的 Mtb 耐药基因突变。

1.1 利福霉素类药物^[3]

利福平(RFP)、利福喷丁(RFT)和利福布丁(RFB)均为一线抗结核药物,其作用靶标 RNA 聚合酶 α 、 β 、 β' 亚单位编码基因 *rpoA*、*rpoB*、*rpoC* 突变均可能导致 Mtb 对其耐受。其中 95% 左右的突变发生在 *rpoB* 507 至 533 位氨基酸密码子,最常见的突变位点是 531 位和 526 位氨基酸密码子。

1.2 异烟肼及异烟酸衍生物^[4]

Mtb 耐异烟肼(INH)主要与过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因(*katG*)缺失或突变以及烯酰基运载蛋白还原酶的调控基因(*inhA*)突变有关;*KatG* 315 位密码子和 *inhA* -15 位是最常见突变位点。而异烟酸衍生物丙硫异烟胺(PTO)和乙硫异烟胺(ETO)耐药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及其激活剂单氧酶编码基因 *ethA* 突变所致。

1.3 乙胺丁醇

Mtb 耐乙胺丁醇(EMB)与阿拉伯糖基转移酶编码基因 *embA*、*embB* 和 *embC* 表达增高或突变有关,其中 *embB* 306 位密码子是最常见突变位点。

1.4 吡嗪酰胺

Mtb 耐吡嗪酰胺(PZA)主要是由于吡嗪酰胺酶编码基因 *pncA*、核糖体蛋白 S1 编码基因 *rpsA* 和天冬氨酸脱羧酶基因 *panD* 突变所致,其中 *pncA* 编码基因突变是最常见原因,相对热点区域位于 3~17、61~85 和 132~142 位密码子^[5]。但应注意的是,部分 *pncA* 突变与耐药无关。

1.5 链霉素

Mtb 耐链霉素(SM)是由于其核糖体蛋白 S12 编码基因 *rpsL* 和 16S *rRNA* 编码基因 *rrs* 突变所致。*RpsL* 43 位和 88 位密码子及 *rrs* 905 位和 513 位核苷酸是最常见的突变位点。

1.6 喹诺酮类药物

Mtb 耐喹诺酮类药物主要是其 DNA 旋转酶的 A 亚单位编码基因 *gyrA* 或 B 亚单位编码基因 *gyrB* 突变所致,其中 *gyrA* 67~106 位密码子是 Mtb 喹诺酮耐药决定区(QRDR)^[6]。

1.7 卡那霉素、氨基羟丁基卡那霉素 A、卷曲霉素和紫霉素

Mtb 耐卡那霉素(KM)、氨基羟丁基卡那霉

素 A(AK)、卷曲霉素(CAP)和紫霉素(VIO)主要与 *rrs* 基因突变有关,其中 A1401G 置换是最常见的突变。此外, rRNA 转甲基酶编码基因 *tlyA* (*rv1694*) 突变也会导致 CPM 和 VM 耐药。

1.8 贝达喹啉和氯法齐明

Rv0678 和 *pepQ* (*rv2535*) 基因突变均会导致 Mtb 对贝达喹啉(BDQ)和氯法齐明(CFZ)低水平的耐受,使两者产生交叉耐药性。此外, *rv1979c* 突变也会导致 Mtb 耐受 CFZ^[8]。

1.9 PA-824 和德拉马尼

Mtb 耐受双环硝基咪唑恶嗪(PA-824)和德拉马尼(双环硝基咪唑恶嗪)主要是由于 F 420 依赖的生物激活途径中的下列 5 个基因突变所致:硝基还原酶基因 *ddn*、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *fgd1*、2-磷酸-L-乳酸转移酶基因 *fbiA*、*fbiB* 和 7,8-二脱甲基-8-羟基-5'-脱氮核黄素-5'-磷酸盐合成酶基因 *fbiC*^[9]。

1.10 大环内脂类药物

Mtb 耐大环内脂类药物可能与其存在单甲基化转移酶 *ermMT* (*rv1988*) 和膜外排泵编码基因 *Tap* (*rv1258*) 有关,使其对该类药物呈天然抗性。

1.11 环丝氨酸

Mtb 耐环丝氨酸(CS)可能与谷氨酸脱羧酶编码基因 *gadA*、D-丙氨酸消旋酶编码基因 *alrA* (*rv3423c*)、D-丙氨酸连接酶编码基因 *ddlA* (*rv2981c*) 和 L-丙氨酸脱氢酶编码基因 *ald* (*rv2780*) 突变有关^[10]。

2 国内常用药物敏感性检测技术及产品

目前采用任何单一的药物敏感性检测方法已不能完全满足临床需求,通常可检测十几种药物的表型药敏方法与快速检测部分药物耐药基因型的分子药敏方法相结合,优势互补,从而快速、灵敏地诊断耐药 TB。

2.1 表型检测方法

该方法是建立在培养基础上的,通过观察 Mtb 在含药培养基中的生长情况来检测其耐药性,是目前耐药检测的金标准。由于 Mtb 慢生长的特性决定了该方法需较长时间,但其可检测较多种类药物的耐药性。

2.1.1 传统的药敏试验方法 在含抗结核药物的固体培养基上,检测 Mtb 的生长情况以判断其对药物的

敏感性,我国常用绝对浓度法和比例法。WHO 建议采用比例法作为 DST 的标准,当耐药菌比率超过 1% 时即可诊断耐药。目前已有商业化的产品。该方法的优点是可同时检测十几种一线和二线抗结核药物的单药和两种药物联合的耐受水平,简单、经济,适用于基层;其缺点是培养时间长,通常需 1~2 月时间。

2.1.2 分枝杆菌快速培养药敏试验方法 在含抗结核药物的液体培养基中,通过 BACTEC MGIT 960^[11] 和 BacT/ALERT3D 分枝杆菌快速培养系统^[12] 检测 4~5 种一线抗结核药物的药敏试验,其优点是较快速,只需 1~2 周时间;其缺点是进口试剂成本高,目前尚不能检测二线抗结核药物的敏感性。

2.1.3 分枝杆菌药敏检测板 美国赛默飞世尔科技有限公司(Thermo Scientific)基于微量肉汤稀释法原理开发的分枝杆菌药敏检测板 Sensititre[®] MYCOTB,可检测 12 种一线和二线抗结核药物[包括 RFP、RFB、INH、EMB、SM、氧氟沙星(OFX)、莫西沙星(MFX)、阿米卡星(AM)、对氨基水杨酸(PAS)、ETO、KM、CS]的耐药性,只需 10 d 时间。其优点是可获得抗结核药物的最低抑菌浓度(MIC),为临床提供更确切的耐药信息;缺点是实际应用中某些药物的 MIC 值不好判读^[13]。

2.2 分子或基因检测方法

该方法是采用分子生物学技术检测、鉴定 Mtb 的耐药基因突变型。近年来随着 Mtb 对一线、二线抗结核药物耐药分子机制的阐明,已有多个产品问世并在我国临床应用。分子检测的优点是可快速、灵敏地从临床标本中检出耐药 Mtb,甚至涂阴、培阴的标本,但检测的药物种类有限。

2.2.1 Xpert MTB/RIF 试验^[14] 是美国 Cepheid 公司开发的一种基于 GeneXpert 核酸提取、扩增、检测一体化系统的 Mtb 和 RFP 耐药快速检测试剂盒,其优点是自动化地同时检测 Mtb 基因及 RFP 耐药基因型,操作简便,即时检测,快速只需 110 min,样本裂解、核酸提取、PCR 体系配置、扩增和检测步骤全部在密封体系中完成,生物安全性高,无需专门的分子生物学实验室;缺点是只能检测一个抗结核药物 RFP 的耐药性。

2.2.2 MeltPro Mtb 耐药检测系统^[15] 我国厦门致善生物科技股份有限公司产品,其采用多色探针熔解曲线法快速检测 Mtb RFP、INH、SM、EMB 和氟

喹诺酮类药物耐药基因型,优点是较简便、快速、闭管检测,无需繁琐的杂交、显色过程,只需 2~3 h,可较全面地了解耐药基因突变信息;缺点是不报告具体的突变类型。

2.2.3 晶芯[®]Mtb 耐药检测基因芯片^[16] 我国北京博奥生物集团有限公司产品,可快速检测 Mtb RFP 和 INH 常见耐药基因型,只需 1 d 时间。其优点是较简便、快速;缺点是杂交、检测过程较繁琐。

2.2.4 耐药结核分枝杆菌诊断试剂(线性探针实验) 德国 Hain 生命科学公司开发的 GenoType[®] MTBDR-plus 检测试剂盒可同时检测 RFP 和 INH 耐药基因型^[17],GenoType[®] MTBDRsl 检测试剂盒可同时检测 EMB、喹诺酮类、氨基糖苷类耐药基因型^[18],只需 1~2 d 时间。其优点是较简便、快速;缺点是杂交、显色过程较繁琐。

3 Mtb 药敏检测结果的临床意义

DST 结果可使临床医师了解患者 Mtb 对各种抗结核药物的敏感或耐受程度,指导临床医师选择合适的药物组成合理的化疗方案^[19],尤其对复治和难治患者更有价值。

DST 结果显示对任何 1 种抗结核药物耐药,被称为单耐药(mono-resistance);对 2 种以上抗结核药物耐药,但不同时包括 INH 和 RFP,被称为多耐药(poly-resistance);同时对 INH 和 RFP 耐药,被称为耐多药(multi-drug resistance, MDR);同时对 INH、RFP、氟喹咯酮类、一种注射针剂耐药,被称为广泛耐药(extensive drug resistance, XDR);同时对所有抗结核药物耐药,被称为完全耐药(total drug resistance, TDR)。近年来 DST 在临床上的重要性逐渐被认识和应用,但表型药敏试验和分子药敏试验所反映的深层次的基础问题及临床意义仍值得我们深入探讨。

我国 TB 患者中, RFP 耐药 90%~95% 是由于 *rpoB* 突变所致,其中 531 位、526 位和 513 位密码子突变通常导致大多数 Mtb 对 RFP、RFT 高水平耐药,而对 RFB 高水平和低水平的耐药各占一半;514 和 533 位密码子突变一般导致低水平耐药;508 位和 509 位氨基酸置换已证实与耐 RFP 无关。RFP 分子药敏检测结果与表型药敏试验结果具有较好的一致性, RFP 与 RFT 和 RFB 有 70%~90% 的交叉耐药率^[3]。因此, RFP 耐药一般不主张更换为

RFT,是否更换为RFB需根据表型药敏结果确定,RR-TB通常采用二线抗结核药物治疗。

我国TB患者中,INH耐药70%~80%是由于*katG* 315位密码子突变所致,应认识到该突变只是导致*katG*酶活性降低,但仍能催化INH转换为其活性型异烟酸而发挥抗结核作用,只是转换效率降低,表型药敏试验通常表现为Mtb对INH低水平耐受或敏感,建议临床上加大INH剂量或加用PAS或更换为PAS-INH或PTO或ETO。10%左右患者Mtb*katG*完全缺失,一般会导致高水平耐INH,继续应用INH治疗效果不理想,建议更换为PTO或ETO。10%左右患者Mtb菌株*inhA*-15位核苷酸突变,表型药敏试验通常表现为Mtb对INH、PTO、ETO低、中或高水平耐受或敏感。因此,*inhA*15位突变会导致INH与PTO、ETO有一定的交叉耐药性^[4]。

我国TB患者中,大多数EMB耐药是由于*embB*基因突变所致,47%~89%发生在306位密码子。*EmbB* 306位氨基酸置换通常导致Mtb对EMB中等水平耐药,但临床上适度增加EMB的剂量仍有效。因此,建议常规的EMB药敏试验结合*embB* 306基因检测,以指导EMB剂量的调整^[20]。

*GyrA*突变通常导致Mtb中、高水平耐受喹诺酮类药物,如存在*gyrA*突变的耐CIP菌株通常MICs>2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。75%~94%的耐环丙沙星(CIP)Mtb菌株、87%的耐MXF菌株和83%的耐OFX菌株存在*gyrA*突变,其中94位Asp→Asn或His或Gly或Tyr或Ala和90位Ala→Val是较常见的突变位点。*GyrA* Ala90Val突变株的MXF MICs通常低于OFX,Ala90Val和Ser91Pro突变患者仍可采用标准MXF剂量或增加MXF剂量治疗;而94位突变菌株对MXF呈现中等水平耐药(MIC=2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),其临床意义尚需进一步研究^[21]。*GyrB*突变通常导致低度耐喹诺酮,*gyrB*突变率很低。

*EthA*突变通常导致Mtb高耐ETO,大约76%的分离株ETO MICs>50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,与氨硫脲、戊氧苯硫脲(thiocarlide)有广泛的交叉耐药性^[22]。

*Rrs*基因突变通常导致Mtb高耐KM、AK、CAP和VIO,这4个药之间通常存在不同程度的交叉耐药性,最常见的突变是A1401G(50%~60%)^[23]。CPM和KM耐药率明显高于AK,AK高水平耐药

株一般也高耐KM、低耐CAP;CAP耐药率高,大多数为低水平耐药。但基因型和表型之间存在一定的差异,*rrs* A1401G突变可引起KM、AK和CAP耐受,但VIO敏感;*tlyA*和*rrs* A1401G同时突变时,KM和AK MIC与*rrs* A1401G突变株相似,但CAP和VIO MIC高于*tlyA*突变株或*rrs* A1401G突变株;KM低水平耐受时一般CAP敏感,而且无*rrs*突变;KM高水平耐受时一般对CAP也耐受,有*rrs* A1401G或G1484T突变。

异质性耐药问题^[24]:临床标本中的Mtb通常既有敏感菌株、也有耐药菌株,治疗前敏感菌株占优势,有效治疗1~2个月后,敏感菌株逐渐被杀灭,耐药菌株逐渐占优势,DST可能由敏感转为耐药。当基因型药敏检测与表型药敏检测结果不一致时,或同时检出敏感基因型和耐药基因型时,均说明可能存在异质性耐药。因此,疗程中应定期监测药物敏感性,并及时调整化疗方案。但分子药敏检测方法通常需耐药菌株占20%~40%比例方能检出,其检测异质性耐药的灵敏度显著低于表型药敏检测方法。

【参考文献】

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2017[R]. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [2] 张俊仙,吴雪琼.结核分枝杆菌对抗结核药物耐受机制的研究进展[J].中国防痨杂志,2015,37(11):1150-1155.
- [3] 刘银萍,王杰,张俊仙,等.结核分枝杆菌*tpoB*基因突变与三种利福霉素类抗结核药物耐受相关性研究[J].中国病原学杂志,2016,11(11):982-985.
- [4] 刘银萍,王杰,张俊仙,等.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[J].中国防痨杂志,2016,38(9):718-721.
- [5] Ramirez-Busby S M, Valafar F. A systematic review of mutations in pyrazinamidase associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9):5267-5277.
- [6] 张治国,杜春英,张倩,等.我国结核分枝杆菌*gyrA*不同突变类型对氟喹诺酮类药物耐药水平的相关性研究[J].中国防痨杂志,2016,38(9):706-711.
- [7] Haver H L, Chua A, Ghode P, et al. Mutations in the F420 biosynthetic pathway and a nitroreductase 2 enzyme are the primary resistance determinants in spontaneous in vitro selected PA-824 mutants of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9):5316-5323.

- [8] Ismail N A, Omar S V, Joseph L, et al. Defining bedaquiline susceptibility, resistance, cross-resistance and associated genetic determinants: a retrospective cohort study[J]. *Ebio Medicine*, 2018, 28:136-142.
- [9] Fujiwara M, Kawasaki M, Hariguchi N, et al. Mechanisms of resistance to delamanid, a drug for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis*, 2018, 108:186-194.
- [10] Desjardins C A, Cohen K A, Vanisha M, et al. Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate *ahdA* in D-cycloserine resistance[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48 (5):544-551.
- [11] 郭苏珊, 林健雄, 郭金镇, 等. BACTEC MGIT 960 用于结核分枝杆菌直接药敏试验的研究 [J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(10):946-952.
- [12] 黄文忠, 王平平, 吴红照, 等. BacT/ALERT 3D 技术在结核杆菌耐药检测中的应用研究 [J]. *浙江预防医学*, 2014(8):764-767.
- [13] Abdel-Rahman S M, Erfan D, Abdel-Latif W, Kholeif H. Evaluation of Sensititre®MYCOTB panel for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to first and second lines anti-tuberculosis drugs[J]. *Clin Med Diag*, 2016, 6(1):13-19.
- [14] 李静, 林日文, 张灿强. Xpert MTB/RIF 检测痰标本结核分枝杆菌与利福平耐受性的临床应用研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2017, 38(4):480-482.
- [15] Pang Y, Dong H, Tan Y, et al. Rapid diagnosis of MDR and XDR tuberculosis with the MeltPro TB assay in China[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:25330.
- [16] 林明冠, 吴元东, 朱中元, 等. 基因芯片技术在结核分枝杆菌耐药检测中的效果分析 [J]. *中国防痨杂志*, 2018, 40(1):58-62.
- [17] Idrees F, Irfan M, Jabeen K, et al. Diagnostic performance of GenoType® MTBDRplus line probe assay in bronchoalveolar lavage for pulmonary tuberculosis diagnosis in sputum scarce and smear-negative patients[J]. *Int J Mycobacteriol*, 2017, 6(2):122-126.
- [18] Grant T, Jonny P, Marty R, et al. GenoType®Mtbdrsl assay for resistance to second-line anti-tuberculosis drugs[J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016, 9 (9):1-178.
- [19] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南 (2015) [J]. *中国防痨杂志*, 2015, 37(5):421-469.
- [20] Plinke C, Walter K, Aly S, et al. *Mycobacterium tuberculosis* *embB* Codon 306 Mutations Confer moderately increased resistance to ethambutol in vitro and in vivo[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2011, 55(6):2891-2896.
- [21] Kambli P, Ajbani K, Sadani M, et al. Correlating minimum inhibitory concentrations of ofloxacin and moxifloxacin with *gyrA* mutations using the genotype MTBDR sl assay[J]. *Tuberculosis*, 2015, 95(2):137-141.
- [22] Vilchèze C, Jacobs W R Jr. Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: Genes, mutations, and causalities[J]. *Microbiol Spectrum*, 2014, 2(4):MGM2-0014-2013.
- [23] Du Q, Dai G, Long Q, et al. *Mycobacterium tuberculosis* *rrs* A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 77(2):138-142.
- [24] 高旭, 李静, 柳清云, 等. 异质性耐药对结核分枝杆菌表型和基因型耐药检测结果的影响 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(4):260-265.