

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.003

艾滋病合并结核病患者结核分枝杆菌耐药基因突变特征分析*

谢 祺, 张 米, 雷素云, 高 丽, 张桂仙, 杨海花, 董兴齐[△]

(云南省传染病专科医院检验科, 昆明 650301)

摘要:目的 了解云南省艾滋病合并结核病患者中结核分枝杆菌(MTB)耐利福平 RNA 聚合酶 β 亚单位编码基因(rpoB)和耐异烟肼过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因(katG)、烯酰基还原酶编码基因(inhA)突变特点。**方法** 采用基因芯片技术,对该省 208 例艾滋病合并结核病患者标本进行 MTB 利福平耐药相关基因 rpoB 和异烟肼耐药相关基因 katG、inhA 分析。**结果** 208 例标本中共 34 例(16.3%)耐药,其中单耐利福平 6 例(2.9%),单耐异烟肼 10 例(4.8%),二者同时耐药 18 例(8.7%)。24 例利福平耐药 MTB 的 rpoB 基因突变位点主要为 531(TCG→TTG),占 66.7%(16/24);28 例异烟肼耐药 MTB 的基因突变位点主要为 katG 基因 315(AGC→ACC),占 78.6%(22/28)。**结论** 云南省艾滋病合并结核病患者中 MTB 利福平和异烟肼耐药基因突变具有多态性,其中耐利福平 rpoB 基因的主要突变位点为 531(TCG→TTG),耐异烟肼 katG、inhA 基因的主要突变位点为 katG 基因 315(AGC→ACC)。

关键词:艾滋病; 结核病; 利福平; 异烟肼; 基因突变; 云南省**中图分类号:**R511;R52**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2018)24-3652-04

Analysis of mutation characteristics of drug-resistant genes of *Mycobacterium tuberculosis* in AIDS patients with tuberculosis*

XIE Qi, ZHANG Mi, LEI Suyun, GAO Li, ZHANG Guixian, YANG Haihua, DONG Xingqi[△]

(Department of Clinical Laboratory, Yunnan Provincial Hospital of Infectious Disease, Kunming, Yunnan 650301, China)

Abstract: Objective To investigate the mutation characteristics of rifampicin-resistant RNA polymerase beta subunit coding gene (rpoB) and isoniazid-resistant catalase-peroxidase coding gene (katG) and enoyl reductase coding gene (inhA) of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in AIDS patients with tuberculosis in Yunnan Province. **Methods** Gene chip technique was used to analyze the Rifampicin resistance related genes rpoB and isoniazid resistance related genes KatG and inhA of *Mycobacterium tuberculosis* in 208 samples of AIDS infected TB patients. **Results** In the 208 samples, 34 (16.3%) were resistant, of which 6 were single Rifampicin resistant (2.9%), 10 were isoniazid resistant (4.8%), and 18 were both Rifampicin and isoniazid resistant (8.7%). The mutation of rpoB gene in 24 cases of Rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* was mainly 531 (TCG→TTG), accounting for 66.7% (16/24). 28 cases of isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* gene mutation site mainly katG gene 315 (AGC→ACC), accounting for 78.6% (22/28). **Conclusion** There is a polymorphism of Rifampicin and isoniazid resistance gene in *Mycobacterium tuberculosis* infected with AIDS in Yunnan Province, the major mutation site of Rifampicin resistant rpoB gene was 531 (TCG→TTG), and the major mutation site of isoniazid resistant katG and inhA genes was katG gene 315 (AGC→ACC).

Key words: AIDS; tuberculosis; rifampicin; isoniazid; gene mutation; Yunnan Province

全球人类免疫缺陷病毒合并结核分枝杆菌(HIV/MTB)感染的病例逐年增多,每年增幅近 10%^[1]。2016 年全世界 1 040 万新发结核病患者中估计有 103 万(9.9%)为 HIV 感染者,其中死于 HIV 相关结核病的人数达 37.4 万。在 HIV 感染者中结核病控制面临的最大问题是无法准确、快速地诊断出

结核病患者^[2]。故 HIV/MTB 感染给艾滋病及结核病的预防和治疗带来了巨大的挑战,也成为全球极其紧迫的公共卫生问题。耐多药结核病发现和治疗的危机仍然严重,2016 年共新发 1 040 万结核病,其中新发耐多药结核病例估计有 49 万,其中只有近 13 万登记接受诊疗;2013 年,全球耐多药结核病治疗成功

* 基金项目:云南省科技计划资助项目(2016BC005)。

作者简介:谢祺,女,副主任技师,主要从事艾滋病及结核病实验室检测工作。△ 通信作者,E-mail:894861485@qq.com。

率为 52%^[2]。此外, HIV/MTB 感染者的诊治有其特殊性, 涉及抗结核和抗-HIV 治疗 2 个方面, 药物不良反应、服药依从性、药物间相互作用均会影响治疗效果, HIV 感染者结核病的治疗成功率也相对较低^[3]。MTB 耐药性监测对 HIV/MTB 感染者极为重要。利福平(RFP)和异烟肼(INH)是结核病治疗中最重要的两种一线药物, 结核病患者如果对这两种药物产生耐药将给治疗带来极大的困难。了解 RFP 及 INH 耐药株相关耐药基因突变特征, 对揭示 MTB 耐药机制, 实现对耐药 MTB 的快速检测有重要意义。本研究采用基因芯片技术对云南省 208 例 HIV/MTB 感染者标本进行 MTB 耐 RFP 基因 rpoB 聚合酶 β 亚单位编码基因(rpoB), 耐 INH 基因过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因(katG)、烯酰基还原酶编码基因(inhA)的常见突变位点检测, 以了解云南省 HIV/MTB 感染者 MTB 耐 RFP 基因 rpoB、耐 INH 基因 katG、inhA 突变频率和突变特征, 以期阐明云南省 HIV/MTB 感染者 MTB 对 RFP 和 INH 的耐药机制及分子基础, 为 HIV/MTB 感染者 MTB 耐药的快速诊断和筛选提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 9 月至 2017 年 12 月本院感染科收治的 HIV/MTB 感染者 208 例, 其中男 144 例, 女 64 例, 年龄 17~83 岁, 平均(39.9±12.7)岁。所有患者 HIV 感染的诊断均符合原国家卫生部 2008 年颁布的《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》, 所有患者标本抗酸染色或分枝杆菌培养阳性且经基因芯片技术菌种鉴定证实为 MTB。208 例标本中痰液 152 例, 脓液 20 例, 灌洗液 15 例, 胸腔积液 13 例, 腹水 4 例, 粪便 4 例。

1.2 仪器与试剂 采用北京博奥生物有限公司生产的 MTB 耐药基因芯片检测试剂及 LuxScan10K-B 微阵列芯片扫描仪等配套仪器进行检测。

1.3 方法 MTB 耐药基因检测包括两种一线药物(RFP 及 INH)的 3 种耐药相关基因(rpoB、katG 及 inhA)启动子的野生型及不同变异型。对于 RFP 耐药相关基因 rpoB 检测 6 个位点, 包括 511 位 TCG→TTG、531 位 TCG→TGG、526 位 CAC→GAC、526 位 CAC→TAC、526 位 CAC→CTC、526 位 CAC→CGC、511 位 CTG→CCG、513 位 CAA→CCA、513 位 CAA→AAA、516 位 GAC→GTC、516 位 GAC→TAC、516 位 GAC→GGC、533 位 CTG→CCG 等 13 种突变型; 对于 INH 耐药相关基因 katG 及 inhA 基因启动子各检测 1 个位点, 分别为 katG 基因 315 位 AGC→ACC 和 AGC→AAC 2 个突变型, inhA 基因启动子 15 位 C→T 突变型。检测探针和对照探针各重复 5 个点, 每行 1~5 和 6~10 分别为同一探针, RFP 相关 rpoB 基因的探针排列示意见表 1, INH 相关 katG 基因和 inhA 基因的探针排列示意见表 2。

表 1 RFP 相关 rpoB 基因的探针排列

探针位置(1~5)	探针位置(6~10)
QC	EC
BC	rpoB IC
分枝杆菌属	MTB 属
511WT(CTG)	511(CTG→CCG)
513WT(CAA)	513(CAA→AAA)
516WT(GAC)	513(CAA→CCA)
533WT(CTG)	533(CTG→CCG)
531WT(TCG)	531(TCG→TTG)
526WT(CAC)	531(TCG→TGG)
526(CAC→TAC)	526(CAC→GAC)
526(CAC→CTC)	526(CAC→CGC)
516(GAC→GTC)	516(GAC→TAC)
516(GAC→GGC)	NC
EC	QC

注: QC 为表面化学质控探针; EC 为杂交阳性外对照探针; BC 为空白对照; NC 为阴性对照探针; IC 为内对照探针; WT 为野生型

表 2 INH 相关 katG 基因和 inhA 基因的探针排列

探针位置(1~5)	探针位置(6~10)
QC	EC
BC	BC
分枝杆菌属	MTB 属
katG IC	inhA IC
katG 315 WT(AGC)	inhA -15WT(C)
katG 315 (AGC→ACC)	inhA -15(C→T)
katG 315 (AGC→AAC)	NC
EC	QC

注: QC 为表面化学质控探针; EC 为杂交阳性外对照探针; BC 为空白对照; NC 为阴性对照探针; IC 为内对照探针; WT 为野生型

1.3.1 标本制备 取患者标本加入离心管中, 95 ℃ 水浴 30 min 灭活处理后加等体积 N-乙酰-L 半胱氨酸-氢氧化钠对本标本进行液化处理, 取 1 mL 液化标本加入离心管高速离心后去上清液备用。将处理好的标本放入晶芯 ExtractorTM 36 核酸快速提取仪中提取核酸, 再将提取到的核酸加入到基因扩增仪中进行扩增, 并将得到的核酸置于 -20 ℃ 保存。

1.3.2 芯片杂交 取杂交缓冲液 9 μL、聚合酶链反应(PCR)产物 6 μL, 混匀, 95 ℃ 热浴 5 min, 变性, 在冰水混合物中骤冷 3 min。取 13.5 μL 杂交溶液加入芯片, 置杂交仪, 50 ℃ 杂交 2 h 后置洗干仪内洗涤甩干。

1.3.3 扫描判读 将芯片插入芯片扫描仪内, 运行芯片扫描和结果判读。

2 结果

2.1 RFP 和 INH 总体耐药情况 208 例标本中共

发现 34 例 (16.3%) 耐药, 其中单耐 RFP 6 例 (2.9%), 单耐 INH 10 例 (4.8%), 二者同时耐药 18 例 (8.7%)。

2.2 24 例 MTB 对 RFP 耐药相关基因 *rpoB* 的突变特征 见表 3。208 例标本中共发现 24 例 RFP 耐药基因 *rpoB* 发生突变, 总突变率为 11.5%, 其中单位点突变 23 例 (95.8%), 突变形式主要为 *rpoB*531TCG→TTG; 双位点突变 1 例 (4.2%), 突变形式为 *rpoB*511CTG→CCG 加 *rpoB*516GAC→TAC。

表 3 24 例 MTB 对 RFP 耐药相关基因 *rpoB* 的突变特征

密码子位点	密码子变化	氨基酸变化	突变情况[n(%)]
单突变			
<i>rpoB</i> 531	TCG→TTG	Ser→Leu	16(66.7)
<i>rpoB</i> 526	CAC→TAC	His→Tyr	3(12.5)
<i>rpoB</i> 526	CAC→GAC	His→Asp	2(8.3)
<i>rpoB</i> 511	CTG→CCG	Leu→Pro	2(8.3)
双突变			
	<i>rpoB</i> 511CTG→CCG+	Leu→Pro+	1(4.2)
	<i>rpoB</i> 516GAC→TAC	Asp→Tyr	

2.3 28 例 MTB 对 INH 耐药相关基因 *katG* 和 *inhA* 的突变特征 见表 4。在 208 例标本中共发现 28 例 INH 耐药基因 *katG* 和 *inhA* 发生突变, 总突变率为 13.5%, 其中 *katG* 突变及缺失 26 例, 突变形式主要为 *katG*315 AGC→ACC; *inhA* 突变 2 例, 突变形式为 *inhA*-15C→T。

表 4 28 例 MTB 对 INH 耐药相关基因 *katG* 和 *inhA* 的突变特征

密码子位点	密码子变化	氨基酸变化	突变情况[n(%)]
<i>katG</i> 315	AGC→ACC	Ser→Thr	22(78.6)
<i>katG</i> 315	AGC→AAC	Ser→Asn	3(10.7)
<i>katG</i>	缺失		1(3.6)
<i>inhA</i> -15	C→T		2(7.1)

3 讨 论

RFP 与 INH 是应用最广泛的一线抗结核药物, 二者组合能取得较好的疗效, 但由于长期治疗不当, 包括治疗方案不当、剂量不足、患者依从性差等原因, RFP 与 INH 耐药率呈上升趋势, 这也是 TB 在全球再次暴发难以控制的主要原因之一。MTB 的耐药性是相关基因突变引起的, 故对 RFP 和 INH 的耐药性进行检测对临床治疗结核有积极意义^[4]。

传统的 MTB 药敏试验阳性率低、培养周期长, 给临床上 HIV/MTB 感染者的诊断和治疗带来了极大的困难。基因芯片是近几年在医疗领域最具影响力的分子生物学检测技术, 可通过检测耐药突变基因的存在与否协助判断 MTB 的耐药情况。国内多中心验证结果表明, 基因芯片技术检测 RFP、INH 耐药性, 其敏感度分别为 87.56%、80.34%, 特异度分别为

97.95%、95.82%^[5]。基因芯片技术适宜多种类型标本的检测, 检测时间较传统方法明显快速, 从而做到及早诊断、及时选择敏感药物, 及时控制结核病疫情。

多项研究结果表明, HIV/MTB 感染者对抗结核药物的耐药性以耐 RFP 和 INH 最为突出。王印等^[6]报道, 成都地区 196 例 HIV 合并 MTB 双重感染者 MTB 总耐药率为 26.02%, 其中 INH 和 RFP 在 4 种一线抗结核药中耐药率最高, 分别为 21.94% 和 16.33%; 汪亚玲等^[7]对 25 例 HIV 合并 MTB 阳性病例进行耐药性分析发现其耐药率为 16.00%。本研究中 MTB 总耐药率为 16.30%, 与上述报道略有差异, 这可能与研究方法不一致、不同地域传染流行不太一致有关。

RFP 通过与 RNA 聚合酶 β 亚单位结合, 干扰、抑制 mRNA 的转录, 从而达到杀菌的效果, *rpoB* 基因突变使 RNA 聚合酶高度保守的氨基酸发生置换, 进而阻止 RFP 的结合而导致耐药。在 MTB 耐 RFP 分离株中, 90% 以上在所分析的 *rpoB* 基因不同部位存在多种突变, 突变一般发生在 *rpoB* 507~533 位 27 个氨基酸密码子 (81 bp) 组成的 RFP 耐药决定区 (RRDR) 内。其中最常见突变位点是 531 位的丝氨酸 (Ser) (40%~60%)、526 位的组氨酸 (His) (30%~36%)、516 位的天冬氨酸 (Asp) (7%~9%)^[8]。*rpoB* 基因突变特征具有明显的地域性差异, 不同国家和地区 RFP 耐药 MTB 的 *rpoB* 基因变异谱和变异率呈现出不同的特点, 这可能与 *rpoB* 特定位点突变致耐 RFP 菌种在某一特定地域传染流行有关, 也可能与研究标本量少和抽样方法不一致有关。本研究结果显示, 云南省 HIV/MTB 感染人群中 RFP 耐药 MTB 的 *rpoB* 基因突变以 RRDR-531 (TCG→TTG, Ser→Leu) 为主 (66.7%)。国内外研究结果表明, 531 位密码子突变一般导致高水平耐药, 与传统药敏试验有较好的一致性, 该突变作为 RFP 耐药 MTB 诊断的分子标记靶点有较好的临床应用价值。

MTB 对 INH 的耐药机制与 *katG*、*inhA* 和 *ahpC* 基因的启动子缺失或突变有关, 其中 *katG* 完全缺失或点突变是最主要的耐药机制^[9]。*katG* 基因变异会导致其编码产物过氧化氢-过氧化物酶的活性丧失或降低, 使 INH 不能活化, 从而不能攻击分枝菌酸, 导致 MTB 对 INH 耐药^[10]。*inhA* 启动子变异会增强烯酰基乙酰载体蛋白还原酶的表达, 超过了药物抑制作用, 从而使菌株耐受 INH^[11]。*katG* 基因中常见的突变率位点是 315 位 (AGC→ACC, Ser→Thr), 发生率约为 60.00%^[8]。本研究中云南省 HIV/MTB 感染人群中 INH 耐药 MTB 的 *katG* 基因突变以 315 位 (AGC→ACC, Ser→Thr) 为主 (78.6%), 较 60.00% 略高, 这可能与检测人群不一致、不同地区菌株耐药相关基因变异存在多态性, 突变类型、位点、频率各不相同有关。本研究中还检出 1 例 *katG* 基因完全缺

失,在 MTB 耐 INH 分离株中,有 2%~10% 的分离株发生 katG 基因完全缺失,而且主要出现在高度耐 INH 菌株中,故 katG 基因缺失对 MTB 耐 INH 有较好的指导意义。在 MTB 耐 INH 分离株中,10%~35% 的分离株在 inhA 启动子区域发生突变,最常见的突变位点是 15 位^[8]。本研究中仅有 2 株耐药菌检出 15 位突变,原因可能是该基因耐药株不是云南省 HIV/MTB 人群中流行的优势耐药菌株,或者此基因变异率不高,但尚需扩大标本量进行验证。

综上所述,本研究阐明了云南省 HIV/MTB 感染者中 MTB 耐 RFP rpoB 基因的主要突变位点为 531 (TCG→TTG),耐 INH katG,inhA 基因的主要突变位点为 katG 基因 315 (AGC→ACC),其作为耐多药结核诊断的分子标记靶点有较好的临床应用价值。

参考文献

[1] 黄绍萍,卢水华,卢洪洲. 人类免疫缺陷病毒感染并发结核死亡病例的特点[J]. 医药导报,2010,29(3):295-297.

[2] 赵连爽,代娣,陈昕,等. 基因芯片在分枝杆菌菌种鉴定及结核耐药基因检测的诊断价值[J]. 检验医学与临床,2014,11(12):1595-1598.

[3] 李太生,卢洪洲,沈银忠,等. HIV 合并 MTB 感染诊治专家共识[J]. 中华临床感染病杂志,2017,10(2):81-89.

[4] 康丽菲,朱桂云,李秀武,等. 基因芯片技术检测 MTB 对利福平和异烟肼耐药性的研究[J]. 河北医药,2012,34(16):2412-2414.

[5] 柳正卫,黄玉,赵雁林. MTB 基因突变检测方法研究进展[J]. 中国防痨杂志,2013,35(9):748-751.

[6] 王印,朱迎春,周锐峰,等. HIV/AIDS 合并结核病患者 196 株 MTB 耐药分析[J]. 重庆医学,2017,46(9):1203-1205.

[7] 汪亚玲,祁燕伟,万荣,等. HIV/AIDS 合并结核感染患者中分枝杆菌检测技术比较和耐药表型研究[J]. 中华临床医师杂志,2012,6(8):2115-2119.

[8] 张贺秋,赵雁林. 现代结核病诊断技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:27-29.

[9] ERGESHOV A, ANDREEVSKAYA S N, LARIONOVA E E, et al. The spectrum of mutations in genes associated with resistance to rifampicin, isoniazid, and fluoroquinolones in the clinical strains of *M. tuberculosis* reflects the transmissibility of mutant clones[J]. Mol Biol, 2017, 51(4):595-602.

[10] BURTSCHER D, VAN DEN BERGH R, TOKTOSUNOV U, et al. My favourite day is sunday: community perceptions of (drug-resistant) tuberculosis and ambulatory tuberculosis care in kara suu district, osh province, kyrgyzstan[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0152283.

[11] ISAKOVA J, SOVKHOZOVA N, VINNIKOV D, et al. Mutations of rpoB, katG, inhA and ahp genes in rifampicin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyz Republic[J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1):22-26.

(收稿日期:2018-05-27 修回日期:2018-09-04)

(上接第 3651 页)

[3] SAVAGNER P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon[J]. Ann Oncol, 2010, 7(1):89-92.

[4] PIETROFESA R, TUROWSKI J, TYAGI S, et al. Radiation mitigating properties of the lignan component in flaxseed [J]. BMC Cancer, 2013, 13(1):179-185.

[5] BERMAN A T, TUROWSKI J, MICK R, et al. Dietary flaxseed in non-small cell lung cancer patients receiving chemoradiation[J]. J Pulm Respir Med, 2013, 3(4):154-159.

[6] FLECKENSTEIN K, GAUTER-FLECKENSTEIN B, JACKSON I L, et al. Using biological markers to predict risk of radiation injury[J]. Semin Radiat Oncol, 2007, 17(2):89-98.

[7] BAKKAL B H, GULTEKIN F A, GUVEN B, et al. Effect of ozone oxidative preconditioning in preventing early radiation-induced lung injury in rats[J]. Braz J Med Biol Res, 2013, 46(9):789-796.

[8] SPALEK M. Chronic radiation-induced dermatitis: challenges and solutions[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2016, 9(1):473-482.

[9] ROSENTHAL R A, FISH B, HILL R P, et al. Salen Mn complexes mitigate radiation injury in normal tissues[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2011, 11(4):359-372.

[10] LUZINA I G, TODD N W, NACU N, et al. Regulation of pulmonary inflammation and fibrosis through expression of integrins $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ on pulmonary T lymphocytes [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(5):1530-1539.

[11] ZHOU Y, SHAO G, LIU S. Monitoring Breast Tumor Lung Metastasis by U-SPECT-II/CT with an Integrin $\alpha V\beta 3$ -Targeted Radiotracer ^{99m}Tc-3P-RGD(2) [J]. Theranostics, 2012, 2(6):577-588.

[12] ZHOU Y, KIM Y S, CHAKRABORTY S, et al. ^{99m}Tc-labeled cyclic RGD peptides for noninvasive monitoring of tumor integrin $\alpha V\beta 3$ expression[J]. Mol Imaging, 2011, 10(5):386-397.

[13] YU X, WU Y, LIU H, et al. Small-animal SPECT/CT of the progression and recovery of rat liver fibrosis by using an integrin $\alpha V\beta 3$ -targeting radiotracer [J]. Radiology, 2016, 279(2):502-512.

(收稿日期:2018-05-15 修回日期:2018-08-20)