

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.22.011

延安市结核分枝杆菌耐药性与耐药基因检测结果分析*

阳 央¹, 侯 欢², 王 东², 李 慧³, 冯 智², 李芳芹^{3△}

1. 延安大学医学院, 陕西延安 716000; 2. 陕西省延安市第二人民医院检验科, 陕西延安 716000;
3. 延安大学附属医院检验科, 陕西延安 716000

摘 要:目的 探讨延安市结核分枝杆菌耐药性及相关耐药基因突变特征, 为临床治疗及结核防控提供参考。方法 将延安市第二人民医院 2018 年 1 月至 2019 年 8 月住院的肺结核患者共 302 例纳入研究, 采用微孔板最低抑菌浓度(MIC)法对一线及部分二线抗结核药物进行药敏试验, 同时应用荧光 PCR 溶解曲线法对利福平(RIF)及异烟肼(INH)表型耐药菌株进行耐药基因突变检测。结果 302 例患者中男性 181 例, 女性 121 例, 男女比为 1.49 : 1, 总体耐药率为 24.5%(74/302), 单耐药率为 13.6%, 多耐药率为 5.0%, 耐多药率为 6.0%, 且男性耐药率高于女性(28.7% vs. 18.2%, $P=0.037$); 一线药物耐药率: INH(17.2%) > 链霉素(SM)(11.3%) > RIF(7.6%) > 乙胺丁醇(EMB)(1.3%), 二线药物耐药率均较低; 耐药模式主要以 INH 耐药但 RIF 敏感结核(INHR-TB)为主, 占 46.0%(34/74), 耐多药以耐 SM+RIF+INH 模式常见, 占 66.7%(12/18)。RIF 耐药菌株中 87.0% 存在 rpoB 基因突变, Kat G315 和 inhA 突变介导了 88.5% 的 INH 耐药。结论 该地区以药物敏感结核和 INHR-TB 为主, INH 耐药和耐多药结核的出现应引起重视, 进行耐药基因突变的快速检测有助于结核的治疗和防控。

关键词: 结核分枝杆菌; 耐药性; 耐药模式; 溶解曲线法; 耐药突变

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)22-3264-03

Test results analysis of drug resistance and drug resistance gene for tuberculosis in Yan'an city*

YANG Yang¹, HOU Huan², WANG Dong², LI Hui³, FENG Zhi², LI Fangqin^{3△}

1. Medical College of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Yan'an City, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China

Abstract: Objective To explore the mutational characteristics of drug resistance and related drug resistance genes of tuberculosis(TB) in Yan'an, and to provide reference for clinical treatment and TB prevention and control. **Methods** Patients with pulmonary TB hospitalized in the Second People's Hospital of Yan'an City from January 2018 to August 2019 were enrolled in the study, microporous plate MIC method was used to test the drug susceptibility of first- and some second-line anti-TB drugs. At the same time, the mutation of rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) phenotypic resistant strains was detected by fluorescence PCR melting curve method. **Results** Of the 302 patients, 181 were male and 121 were female, with a male-to-female ratio of 1.49 : 1, the overall drug resistance TB rate was 24.5%(74/302), the overall mono-drug resistance TB rate was 13.6%, the overall poly-drug resistance TB rate was 5.0%, the overall multi-drug resistance TB rate was 6.0%, and the incidence of any drug resistance in men is significantly higher than that in women(28.7% vs. 18.2%, $P=0.037$). First-line drug resistance rate INH(17.2%) > SM(11.3%) > RIF(7.6%) > EMB(1.3%), second-line drug resistance was lower; The main resistant mode was isoniazid resistance, rifampicin-sensitive pulmonary TB (INHR-TB), accounting for 46.0%(34/74), the major multi-drug resistance mode was SM+RIF+INH drug resistance mode, accounting for 66.7%(12/18). 87.0% of rifampicin-resistant strains had rpoB gene mutations, and Kat G315 and inhA mutations mediated 88.5% INA resistance. **Conclusion** Sensitive TB and INHR-TB are the main types in this area, the emergence of INA resistance and multi-drug resistant TB should be paid attention to. Rapid detection of drug-resistant mutations by using the fusion curve method will be helpful in the prevention and treatment of TB.

* 基金项目: 延安市科技重点研发项目(SL2019ZC SY-103)。

作者简介: 阳央, 男, 硕士研究生在读, 主要从事细菌耐药及病原学诊断方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: yadxxy1991@163.com。

Key words: Mycobacterium tuberculosis; drug resistance; drug resistance mode; melting curve analysis; drug resistance mutation

世界卫生组织 2019 年结核防控报告中提到, 2018 年中国新发结核病患者约 86.6 万例, 平均发病率为 61/100 000, 是结核病高负担国, 也是耐多药结核(MDR-TB)第二大国家^[1]。结核的流行和 MDR-TB 的出现及持续蔓延, 已经成为有效控制结核病的严重威胁; 世界卫生组织建议对所有疑似结核病患者进行标准治疗前都应进行结核药敏试验, 以避免获得性耐药的进一步产生^[2]。延安地处中国西北黄土高原, 是结核病较为严重的地区, 但本地区结核耐药的流行情况、模式及分子基础仍不清楚, 本研究旨在调查延安地区结核耐药流行情况、模式及重要抗结核药物利福平(RIF)、异烟肼(INH)的耐药基因突变特点。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将延安市第二人民医院 2018 年 1 月至 2019 年 8 月住院的肺结核患者共 302 例纳入研究, 男 181 例, 女 121 例(男女比例为 1.49 : 1), 其痰液标本按照《结核病实验室检验规程》^[3]进行处理。

1.2 仪器与试剂 MGIT 320 结核分枝杆菌快速培养仪器购自 BD 公司, 培养试剂购自希格生物公司; 最低抑菌浓度(MIC)检测的微孔板及试剂购自珠海银科医学公司; Lab-Aid 824 全自动磁珠法核酸提取仪购自厦门致善生物科技公司; SLSN-96 实时荧光 PCR 仪购自上海宏石医疗科技公司。

1.3 方法

1.3.1 药敏表型的检测 将痰液标本用 MGIT 320 培养仪进行快速液体培养, 培养呈阳性并鉴定为结核分枝杆菌的菌株进行结核微孔板 MIC 法药敏试验, 剔除同一患者重复分离菌株的药敏试验结果。

1.3.2 耐药基因突变的检测 对 RIF、INH 有耐药表型的液体培养标本采用磁珠法进行结核分枝杆菌 DNA 的提取, 采用荧光 PCR 溶解曲线法进行耐药基因突变检测。检测 RIF 耐药性决定区域 (RRDR) rpoB 基因和 INH 耐药相关基因 KatG 315 密码子、inhA 启动子区(-17 至 -8 位点)、inhA94 密码子及 ahpC 启动子区(-44 至 -30 位点及 -15 至 3 位点) 是否存在突变来确定耐药性。

1.3.3 结核耐药模式 单耐药: 仅对一种抗结核药物耐药; 多耐药: 对一种以上抗结核药物耐药(同时耐 RIF、INH 的除外); 耐多药: 至少同时耐 RIF 和 INH; 简单耐多药: 只同时耐 RIF 和 INH, 而对其他药物无耐药性; 复杂耐多药结核: 同时耐 RIF 和 INH, 外加对其他一种或一种以上的药物耐药; 广泛耐药结核(XDR-TB): 耐 INH 和 RIF, 同时对任意一种喹诺酮类药物及二线注射类药物(阿米卡星、卡那霉素和卷曲霉素)中的一种耐药; INH 耐药但 RIF 敏感结核(INHR-TB): 对 INH 耐药, RIF 敏感, 对其他一线药

物有或无耐药性^[4]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析, 计数资料采用百分数表示, 组间比较采用 χ^2 或 Fisher 精确检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药结核患者的检出情况 共检出耐药结核病患者 74 例, 男性患者的检出率高于女性 ($P < 0.05$); 不同年龄段患者间结核耐药率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 合并糖尿病与未合并糖尿病的患者比较, 结核耐药率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。对不同抗结核药物的耐药率如下: 链霉素(SM) 11.3% (34/302), INH 17.2% (52/302), RIF 7.6% (23/302), 对氨基水杨酸(PAS) 3.0% (9/302), 乙胺丁醇(EMB) 1.3% (4/11), 左氧氟沙星(LVFX) 1.3% (4/11), 其余药物的耐药率均较低。

表 1 不同性别、年龄段及合并糖尿病情况的肺结核患者发生耐药的情况

分组	n	耐药结核[n(%)]	χ^2	P
年龄(岁)			2.217	0.360
<18	14	1(7.1)		
18~60	201	51(25.4)		
>60	87	22(25.3)		
性别			4.361	0.037
男	181	52(28.7)		
女	121	22(18.2)		
是否合并糖尿病			0.073	0.788
是	50	13(26.0)		
否	252	61(24.2)		

2.2 RIF 与 INH 耐药基因突变分布 有 RIF 耐药表型的菌株中, 存在 rpoB 基因突变的占 87.0% (20/23)。有 INH 耐药表型的菌株: 存在 INH 耐药相关基因突变的占 96.2% (50/52); 具有 KatG 315 密码子突变的占 76.9% (40/52), 其中 3 株合并 inhA 突变, 1 株合并 ahpC 突变; 具有 inhA 突变的菌株占 17.3% (9/52); 具有 ahpC 突变的菌株占 3.8% (2/52); 3 株 INH 耐药由 KatG 基因缺失导致; KatG 315 密码子和 inhA 启动子区突变介导了 88.5% (46/52) 的 INH 耐药, 未发现 inhA94 密码子的突变菌株。

2.3 结核耐药模式的分布 单耐药率为 13.6% (41/302); 多耐药率为 5.0% (15/302); 耐多药率为 6.0% (18/302), 见表 2。耐药模式以 INHR-TB 为主, 占 46.0% (34/74)。MDR-TB 患者平均年龄 41 岁, 男 12 例, 女 6 例, 男女比例为 2 : 1, 其中 5 例合并糖尿病(男 4 例, 女 1 例)。耐多药以耐 SM + RIF + INH

模式常见,占 66.7%(12/18)。

表 2 结核耐药模式分布(n)

结核耐药模式	耐受药物	n
单耐药	SM	13
	INH	22
	RIF	2
	EMB	0
	LVFX	2
	PAS	2
多耐药	RIF+其他	3
	INH+其他	12
	其他	0
耐多药	RIF+ZNH	5
	RIF+INH+其他	13

3 讨 论

药物敏感结核患者经过 4~6 个月的有效抗结核治疗,绝大多数(90%以上)能获得痊愈;而对于 MDR-TB 及 XDR-TB 患者,治疗时间最长达 24 个月。最新的 MDR-TB 治疗转归数据显示,全球治疗成功率仅有 56%^[1]。随着新药及快速诊断方法的应用^[5-6],结核病发病率及病死率有所下降。

本研究中,结核的耐药率为 24.5%(74/302),低于全国结核病耐药性基线调查报告(2007—2008 年)中的数值(37.8%)^[7];分离的结核分枝杆菌对主要一线药物的耐药情况:除对 SM(11.3%)和 EMB(1.3%)的耐药率低于全国普查水平(SM:28.93%,EMB:6.52%)外,INH(17.2%)和 RIF(7.6%)与全国水平(INH:18.96%,RFP:9.63%)差异不明显;SM 耐药率低于全国水平,可能与近 20 年未将其纳入抗结核治疗药物有关。本研究得出的总体耐药率、单耐药率、多耐药率、耐多药率均高于青岛(19.8%、11.8%、2.9%、5.4%)^[8];单耐药和多耐药率均高于绍兴(5.3%、2.1%),而耐多药率低于绍兴(12.8%)^[9];总耐药率低于新疆、甘肃、西藏(总耐药率分别为 42.9%、40.8%、64.2%),与内蒙古地区(23.81%)相差较小,RIF 耐药率明显低于上述地区,INH 耐药率高于甘肃,低于西藏、新疆,与内蒙古相差较小,SM 及 EMB 的耐药率均显著低于上述 4 个地区^[10]。本研究的肺结核患者中,男性多于女性,而且男性相对于女性更易发生耐药,这可能与男性比女性有更多的社会活动,接触肺结核患者的机会更多,治疗的依从性差有关。

在耐药基因突变分析中,87.0%的 RIF 耐药与 rpoB 基因突变有关,90.0%以上的 INH 耐药与 KatG 基因、inhA、ahpC 基因突变有关,可见熔解曲线法快速检测相关耐药基因突变对于早期识别耐药结核十分重要。本研究中 3 株耐 RIF 表型菌株和 2 株耐 INH 表型菌株未发现相关耐药基因的突变,可能由其他耐药机制引起或与耐药菌所占比例低有关(熔解曲线法耐药突变检测下限为 40%)。rpoB 基因突变影

响药物的结合是 RIF 耐药性产生的主要原因,利用分子生物学方法快速发现 RIF 耐药突变菌株,对治疗的选择和结核的防治至关重要。本研究发现,INH 耐药主要由 KatG 315 密码子引起,KatG 315 密码子突变一般认为与较高浓度的 INH 耐药相关(MIC>6.4 mg/L)^[11],同时,有研究表明 KatG 315 密码子突变与临床治疗失败、死亡和复发的风险增加有关^[12]。本研究还发现了 3 株菌株存在 KatG 基因的缺失,KatG 基因的缺失会导致极高的 MIC(>25.6 mg/L)^[13]。由于本地区 INH 耐药性主要由 KatG 基因突变介导,不建议对存在 INH 耐药的患者采取高剂量 INH 治疗方案。

耐药模式主要以 INHR-TB 为主,耐多药模式以耐 SM+RIF+INH 常见,这可能与本地区 20 世纪广泛使用 SM,SM 使用历史长,原始耐药率高有关。RIF 是一种主要的一线抗结核药物,因其对生长缓慢、甚至休眠的结核杆菌保持活性^[13],因此,在治疗 INHR-TB 患者时使用 RIF 可以获得良好的效果。对于特殊人群(老年人、糖尿病患者等)的肺结核治疗,因药物的相互影响,对 RIF 的毒性及不良反应的不耐受,临床可以选用利福喷丁替代^[14-15]。INHR-TB 是全球最常见的结核耐药模式,如果采用标准一线治疗可能导致治疗失败和 MDR-TB 的进一步增多^[16-17],因此,快速、准确地发现这类患者并及时给予针对性的治疗能减少 MDR-TB 的产生。有研究表明,延长吡嗪酰胺和 RIF 的持续时间,治疗 INHR-TB 时使用 6~9 个月的 RIF、吡嗪酰胺和乙胺丁醇(6-9REZ)方案,其不良结果和获得 RIF 耐药比例明显降低^[4],根据患者病情如果 6-9REZ 方案中添加氟喹诺酮类药物时,可能会有更好的治疗效果^[2]。

MDR-TB 的不适当治疗和管理不善,会导致治疗的失败,还可能转变为 XDR-TB。因此,对于 MDR-TB 患者的治疗,最好在获得喹诺酮类及二线注射类药物的药敏试验或分子药敏试验结果后再确定方案。对药物敏感结核应严格按标准方案治疗,不要随意添加药物(特别是喹诺酮类及氨基糖苷类)或减掉某一药物,以避免耐药性的产生,同时管理好药物敏感结核和 INHR-TB 是抗击 MDR-TB 产生的关键^[2]。基层医院更应该加强宣教和随访,提高治疗依从性。本研究未区分初治和复治患者,但影响不大;95%以上患者都是初治患者,可见本地区结核耐药情况较为严重,特别是 INH 耐药不容忽视。

综上所述,延安市肺结核主要以药物敏感结核和 INHR-TB 患者为主,rpoB、KatG 315、inhA 基因是本地区 RIF、INH 耐药的主要基因突变位点。耐药形势依然严峻,INH 耐药不容忽视,及早发现 INH 耐药、MDR-TB,规范地实施个体化治疗,对结核病患者进行有效管理和护理,是控制结核流行的关键。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018[R]. Geneva:WHO, 2018.
- [2] World Health Organization. WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment [R]. Geneva: WHO, 2019.
- [3] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [4] GEGIA M, WINTERS N, BENEDETTI A, et al. Treatment of isoniazid-resistant tuberculosis with first-line drugs: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(2): 223-234.
- [5] 张俊仙, 吴雪琼. 结核分枝杆菌耐药性检测方法的研究进展[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(2): 227-232.
- [6] CHAKRAVORTY S, ROH S S, GLASS J, et al. Detection of isoniazid-, fluoroquinolone-, amikacin-, and kanamycin-resistant tuberculosis in an automated, multiplexed 10-color assay suitable for point-of-care use[J]. J Clin Microbiol, 2016, 55(1): 183-198.
- [7] 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)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [8] 任志盛, 代晓琦, 王忠东, 等. 青岛市五区(市)结核病耐药情况分析[J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(6): 599-603.
- [9] 高华强, 陈奇峰, 金法祥, 等. 绍兴市肺结核耐药情况分析[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(3): 242-244.
- [10] 李雨晴, 万李, 陈杏, 等. 中国西北四省(区)结核分枝杆菌分离株一线药物耐药状况及其影响因素分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(5): 398-402.
- [11] LEMPENS P, MEEHAN C J, VANDELANNOOTE K,

et al. Isoniazid resistance levels of Mycobacterium tuberculosis can largely be predicted by high-confidence resistance-conferring mutations[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3246.

- [12] JACOBSON K R, THERON D, VICTOR T C, et al. Treatment outcomes of isoniazid-resistant tuberculosis patients, Western Cape Province, South Africa[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(4): 369-372.
- [13] PICCARO G, GIANNONI F, FILIPPINI P, et al. Activities of drug combinations against Mycobacterium tuberculosis grown in aerobic and hypoxic acidic conditions [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(3): 1428-1433.
- [14] 宋丽, 岳峰. 利福喷丁联合胰岛素强化降糖对糖尿病合并肺结核的疗效[J]. 实用中西医结合临床, 2018, 18(2): 1-2.
- [15] 王爱国, 王运才, 吴成勇. 不同抗结核治疗方案用于老年肺癌伴肺结核的临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(11): 1959-1963.
- [16] DHEDA K, GUMBO T, MAARTENS G, et al. The epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and incurable tuberculosis [J]. Lancet Respir Med, 2017, 5(4): 291-360.
- [17] ROMANOWSKI K, CAMPBELL J R, OXLADE O, et al. The impact of improved detection and treatment of isoniazid resistant tuberculosis on prevalence of multidrug resistant tuberculosis: a modelling study[J]. PLoS One, 2019, 14(1): e0211355.

(收稿日期: 2020-03-22 修回日期: 2020-07-16)

(上接第 3262 页)

参考文献

- [1] 于康磊. 某综合医院住院患者焦虑抑郁现状调查及影响因素分析[D]. 青岛: 青岛大学, 2019.
- [2] 林玉婵. 医学院校一年级新生的焦虑情绪及其影响因素分析[D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [3] 高芳凤, 郑伍桂, 车春, 等. 健康体检人群甲状腺结节相关因素研究[J]. 华南预防医学, 2019, 45(6): 536-539.
- [4] 姚小琼, 张源慧, 韦艳春, 等. 三级医院急诊科护士焦虑现状调查分析[J]. 护理研究, 2015, 29(6): 659-662.
- [5] 张文慧, 李儿, 郑丽平, 等. 杭州某新型冠状病毒肺炎定点医院护士的焦虑现状调查及对策[J]. 健康研究, 2020, 41(2): 1-4.
- [6] 李亚洁, 张秀华, 王秀兰, 等. SARS 病区一线护理人员的心理调查和应对管理[J]. 护理研究, 2004, 32(18): 1617-1618.
- [7] 钱湘云, 谢幸尔, 王园园, 等. 参与新发呼吸道传染病救治护士真实体验的质性研究[J]. 现代临床护理, 2016, 15(8): 15-19.
- [8] 唐海波, 邝春霞. 焦虑理论研究综述[J]. 中国临床心理学杂志, 2009, 17(2): 176-177.

- [9] 徐明川, 张悦. 首批抗击新型冠状病毒感染肺炎的临床一线支援护士的心理状况调查[J]. 护理研究, 2020, 34(3): 368-370.
- [10] 黄敏英, 赵冬梅. 综合医院感染科护士要求调岗和辞职原因分析[J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(5): 621-623.
- [11] MO Y, DENG L, ZHANG L, et al. Work stress among Chinese nurses to support Wuhan for fighting against the COVID-19 epidemic[J]. J Nurs Manag, 2020, 28(5): 1002-1009.
- [12] 苏昕, 于淼欣, 李靖. 血管神经病学专业护士焦虑现状及影响因素分析[J]. 中国卒中杂志, 2019, 14(9): 955-958.
- [13] 许辉, 姜桂春, 朱晓平. 辽宁省 1 485 名护士的焦虑症状调查及其相关影响因素分析[J]. 中国医科大学学报, 2018, 47(1): 90-93.
- [14] CHEW N, LEE G, TAN B, et al. A multinational, multi-centre study on the psychological outcomes and associated physical symptoms amongst healthcare workers during COVID-19 outbreak[J]. Brain Behav Immun, 2020, 88: 559-565.

(收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-07-17)