

获得性免疫缺陷综合征合并结核病患者对结核分枝杆菌二线药物耐药特征分析

张玲¹ 孙月² 陈勇^{3,4} 郜桂菊³ 杨思园¹ 万康林⁵ 李兴旺¹

【摘要】目的 了解获得性免疫缺陷综合征(AIDS)合并结核病(TB)患者感染结核分枝杆菌二线药物耐药特点。**方法** 选取2010年4月至2012年10月于北京大学地坛医院教学医院住院的艾滋病合并结核病患者标本,由中国疾病预防控制中心培养鉴定。进行4种一线药物(异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇)和4种二线药物(卷曲霉素、卡那霉素、氧氟沙星、乙硫异烟胺)药敏试验监测,并对所有菌株在*gyrA*、*gyrB*、*rrs*、*tlyA*、*eis*和*ethA*基因位点进行DNA测序以检测基因多态性。**结果** 经培养鉴定共得到31株结核分枝杆菌,其中12株耐卷曲霉素,8株耐氧氟沙星,4株耐卡那霉素,5株耐乙硫异烟胺,耐药率分别为38.71%、25.81%、12.90%和16.13%。7株菌为耐多药菌株,1株菌为广泛耐药菌株,耐药率分别为22.58%和3.23%。耐药菌株最常见的突变位点是*rrs*₁₄₀₁, *gyrA*₉₄和*gyrA*₉₀。一线敏感菌株中氧氟沙星的耐药率显著低于一线耐药菌株($P=0.012$)。性别与结核分枝杆菌耐药差异无统计学意义($P=0.533$),年龄>40岁组的氧氟沙星耐药率低于其余两组($P=0.043$)。结核初治组与复治组患者二线耐药率、CD4水平差异无统计学意义($P=0.333$ 、 0.307)。**结论** AIDS合并TB患者存在二线抗结核药物原发耐药,其中卷曲霉素耐药率最高,其次是氧氟沙星。

【关键词】 获得性免疫缺陷综合征; 结核病; 耐药特点; 分子生物学特征; 二线药物

The second-line drug resistance characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with acquired immune deficiency syndrome and tuberculosis Zhang Ling¹, Sun Yue², Chen Yong^{3,4}, Gao Guiju³, Yang Siyuan¹, Wan Kanglin⁵, Li Xingwang¹. ¹Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital, Beijing 100015, China; ²First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China; ³Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ⁴The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; ⁵National Institute for Communicable Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention/State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control/National Reference Laboratory of Tuberculosis, Beijing 102206, China

Corresponding author: Li Xingwang, Email: ditanlixingwang@163.com

【Abstract】 Objective To explore the second-line drug resistance and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and tuberculosis (TB). **Methods** Specimens of patients with AIDS and TB, hospitalized in Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital from April 2010 to October 2012, were collected and sent to CDC for identification. Four first-line drugs (isoniazid, rifampicin, streptomycin and ethambutol) and four second-line drugs (capreomycin, kanamycin, ofloxacin and ethionamide) susceptibility tests were taken and *gyrA*, *gyrB*, *rrs*, *tlyA*, *eis*, *ethA* loci were detected for genetic polymorphisms. **Results** Total of 31 *Mycobacterium tuberculosis* strains were identified, while 12 isolates showed resistance to capreomycin, 8 strains resistance to ofloxacin, 4 strains resistance to kanamycin and 5 strains resistance to ethionamide. The drug resistance

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.02.008

基金项目: 国家十二五科技重大专项中医药防治重大传染病临床科研基地与技术平台建设(No. 2012ZX10005010-003); 感染病科国家临床重点专科资助项目

作者单位: 100015 北京, 北京大学地坛医院教学医院¹; 100016 北京, 清华大学第一附属医院²; 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院³; 075000 张家口市, 河北北方学院附属第一医院⁴; 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室⁵

通讯作者: 李兴旺, Email: ditanlixingwang@163.com

rates were 38.71%, 25.81%, 12.90% and 16.13%, respectively. Besides, 7 multidrug-resistant isolates and one extensively drug-resistant isolate were identified and the drug resistance rates were 22.58% and 3.23%, respectively. The most frequent mutation loci were *rrs*₁₄₀₁, *gyrA*₉₄ and *gyrA*₉₀. Ofloxacin drug resistance rate was significantly higher in isolates resistant to first-line drugs than first-line drugs sensitive isolates ($P = 0.012$). Gender was not associated with drug resistance ($P = 0.533$). Ofloxacin drug resistance rate was significantly lower in > 40 years old group than the other two groups ($P = 0.043$). There was no drug resistance and CD4 level difference between initial treated group and retreated group ($P = 0.333, 0.307$). **Conclusions** There existed primary drug resistance of second-line anti-tuberculosis drugs in patients with AIDS and TB. Capreomycin drug resistance rate was the highest followed by ofloxacin.

【Key words】 Acquired immune deficiency syndrome; Tuberculosis; Drug resistance; Molecular characterization; Second-line drug

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染是获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS, 简称艾滋病) 最常见的机会性感染, 约有1/3艾滋病患者合并结核感染, 而且混合感染者治疗困难, 病死率高^[1]。耐多药结核分枝杆菌的出现增加了治疗的难度, 给临床治疗带来了挑战。氟喹诺酮类是治疗耐多药结核的核心药物。研究表明混合感染者对一线药物耐药率高^[2], 故增加了二线药物的应用。因此, 了解二线药物的耐药情况有利于临床中及时采取有效措施。我国大多数关于AIDS-TB感染的研究缺乏病原学证据^[3], 而且关于AIDS-TB感染结核分枝杆菌耐药报道较少, 尤其是二线药物耐药情况更为缺乏, 故了解混合感染者对二线药物耐药特点更加迫切。本文主要研究艾滋病患者合并结核分枝杆菌感染中分离的结核分枝杆菌的二线药物耐药及分子生物学特征, 以为临床制定合理的抗结核治疗方案提供参考, 现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

选取2010年4月至2012年10月于北京大学地坛医院教学医院住院的艾滋病合并结核患者的标本, 送至国家结核病参比实验室分离培养并经过菌种鉴定共得到31株结核分枝杆菌。其中男性28例, 女性3例。年龄1.6~60 (34.95 ± 11.79) 岁。感染途径: 22例有明确传播途径, 其中性传播16例 (同性10例), 吸毒传播1例, 血液传播2例, 母婴传播1例, 其他传播途径2例。结核初治患者指以前从未接受过抗结核治疗或治疗时间 < 1个月的患者。复治患者指以前接受过抗结核治疗 ≥ 1个月的患者。

耐多药结核 (MDR-TB) 指至少耐异烟肼和利福平两种药物的结核病。广泛耐药结核 (XDR-TB) 指至少耐异烟肼、利福平, 同时至少耐一种喹诺酮类药物和至少一种二线注射药物 (卡那霉素、卷曲霉素和阿米卡星等) 的结核病。

二、方法

1. 标本采集: 采集患者的痰、支气管肺泡灌洗液、血液、淋巴结分泌物等标本用罗氏培养基或BACTEC MGIT960液体培养基 (美国BD公司) 进行培养。其中血液标本采用BACTEC 9120血培养系统 (美国BD公司) 进行培养, 仪器检测阳性后, 再转种至罗氏培养基进行培养。

2. 菌种鉴定: 对培养阳性的结核分枝杆菌用多位点PCR法进行菌种鉴定, 根据文献报道^[4]和细菌基因数据库选了以下7个基因位点进行检测 (见表1)。PCR反应体系: 2 × PCR Mix (Sigma公司) 13 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, DNA

表1 多位点 PCR 引物序列 (擎科生物公司合成)

引物名称	引物序列 (5'→3')
16s rRNAF	ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC
16s rRNAR	TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA
IS1561'F	CGTGGGTGGGCCCTGGATACGTGAACCTCT
IS1561'R	AACTGCTCACCTGGCCACCACCATTGACT
RV1510F	GTGCGCTCCACCCAAATAGTTGC
RV1510R	TGTCGACCTGGGGCACAAATCAGTC
RV1970F	GCGCAGCTGCCGATGTCAAC
RV1970R	CGCCGGCAGCCTACGAAATG
RV3877/8F	CGACGGGTCTGACGGCCAAACTCATC
RV3877/8R	CTTGCTCGGTGGCCGGTTTTTCAGC
RV3120F	GTCGGCGATAGACCATGAGTCCGTCTCCAT
RV3120R	GCGAAAAGTGGGCGGATGCCAGAATAGT
RV0577F	ATGCCAAAGAGAAGCGAATACAGGCAA
RV0577R	CTATTGCTGCGGTGCGGGCTTCAA

模板1 μl , DNase Free Water 9 μl , 总体系25 μl 。反应条件: 预变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 退火60 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸、10 min。

3. 药敏试验: 在国家结核病参比实验室用比例法^[5]进行药敏试验。四种一线药物为异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇; 4种二线药物为卷曲霉素、卡那霉素、乙硫异烟胺和氧氟沙星, 以上药物均购自Sigma公司。培养基各药物浓度: 异烟肼为0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 利福平为40.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 链霉素为4.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 乙胺丁醇为2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 卷曲霉素为40.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 卡那霉素为30.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 氧氟沙星为2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 乙硫异烟胺为40.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。标准株H₃₇RV作为阳性对照。接种后菌株置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育1~2个月, 第1周每天观察并记录结果, 自第2周每周观察并记录结果。

4. DNA提取: 水煮法提取DNA。取1.5 ml离心管, 加入300 μl TE。刮取生长3~4周的细菌标本, 加入离心管。置于85 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min灭活菌体, 再置于100 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 12 000 r/min、离心5 min。取上清, 即为所需DNA模板。

5. PCR扩增及测序: 对基因突变的高发区设计引物, 并委托擎科生物公司合成(见表2)。进行PCR扩增, 扩增后产物送至擎科生物公司测序。其反应体系共25 μl , 分别为: 2 \times TAP Mix (Sigma公

司) 13 μl , 上游引物1 μl , 下游引物1 μl , DNA模板1 μl , DNase Free Water (Sigma公司) 9 μl 。

基因rrs和tlyA1反应条件: 预变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 退火66 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30个循环; 充分延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。基因tlyA2反应条件: 预变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 退火68 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30个循环; 充分延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

基因eis反应条件: 预变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 退火68 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 30个循环; 充分延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

基因gyrA反应条件: 预变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 退火60 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35个循环; 充分延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。基因gyrB反应条件: 预变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min; 变性94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 退火64 $^{\circ}\text{C}$ 、40 s, 延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 35个循环; 充分延伸72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。

基因ETH1和ETH2反应条件: 预变性95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min; 变性95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 退火延伸65 $^{\circ}\text{C}$ 、1.25 min, 35个循环; 充分延伸65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。

ETH3反应条件为预变性95 $^{\circ}\text{C}$ 、15 min; 变性95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 退火延伸68 $^{\circ}\text{C}$ 、1.25 min, 35个循环; 充分延伸68 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min^[6]。

6. 诊断标准: 艾滋病的诊断参考中国艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准, 结核病的诊断参考中

表2 本研究检测基因突变所用的引物(擎科生物公司合成)

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度($^{\circ}\text{C}$)	目的片段长度(bp)
rrs-F	GCCGCGAGGTTAAGCGAAT	66	352
rrs-R	CGCCCACTACAGACAAGAAC		
tlyA1-F	AGGCGCACGAGGTGTGTGTG	66	527
tlyA1-R	AACGACAGGTCGGCCACTACCAGGT		
tlyA2-F	ATGTCGGATACGGCCAGCTG	68	555
tlyA2-R	ACTTTTCTACGCGCCGTGC		
eis-F	GCGTAACGTCACGGCGAAATTC	59	567
eis-R	GTCAGCTCATGCAAGGTG		
gyrA-F	ATGCAGCGCAGCTACATC	60	509
gyrA-R	TTGTGCGGCGGGATATTG		
gyrB-F	CCGCTGTGATCTCGGTGAAG	64	775
gyrB-R	AGACCCTTGTACCGCTGAATG		
ETH1-F	ACTACAACCCCTGGGACC	65	667
ETH1-R	ATCATCGTCGTCTGACTATGG		
ETH2-F	CCTCGAGTACGTCAAGAGCAC	65	692
ETH2-R	CCTCGACCTTCCCGTGA		
ETH3-F	CGTTGACGGCCTCGACATTAC	68	342
ETH3-R	GGTGGAACCGGATATGCCTG		

国结核病诊断标准。

7. 偏倚处理：DNA测序结果与表型结果不符的，分别进行第2次实验。如果第2次与第1次结果不一致，则分别进行第3次实验。综合3次实验情况决定最终结果。

三、统计学处理

所有引物的设计均采用Clone manager professional suite 8.0设计软件完成。DNA测序结果用bioedit 7.05.3软件进行处理，与已公布的基因序列进行比对。率的比较采用Fisher精确概率法，均数的比较采用*t*检验。SPSS 13.0数据处理软件进行处理，*P* < 0.05为差异具有统计学意义。

结 果

一、结核分枝杆菌标本类型

31例AIDS-TB患者标本主要来自于痰、血液、淋巴结针吸物、脑脊液和胸腹水等。其中血培养阳性的标本所占比例最大，占41.94%；其次为淋巴结分泌物（35.48%）和痰培养（32.26%）。同时测痰和血液标本时，阳性率可达70.97%。1例患者痰培养和血培养同时阳性，2例患者血培养和淋巴结分泌物培养同时阳性，3例患者淋巴结分泌物和血培养同时阳性，详见表3。

二、31株结核分枝杆菌药敏试验结果

31株结核分枝杆菌中，10株菌对8种药物全部敏感，21株菌为耐药菌，耐药率为67.74%。其中7株菌为耐多药菌株，1株菌为广泛耐药菌，耐多药率和广泛耐药率分别为22.58%和3.23%。二线药物中，卷曲霉素耐药率最高，为38.71%（12/31）；其次为氧氟沙星25.81%（8/31）。4种二线药物耐药率为6.45%（2/31），详见表4。本研究发现一线敏感菌株中氧氟沙星的耐药率显著低于一线耐药菌株中氧氟沙星耐药率（*P* = 0.012），其余3种药物在一线敏感菌与耐药菌中无统计学差别，见

表3 31例 AIDS-TB 患者病原学分布

标本类型	阳性例数	百分比（%）
血培养阳性	13	41.94
淋巴结分泌物	11	35.48
痰培养	10	32.26
肺泡灌洗液培养	4	12.90
腹水	2	6.45
脑脊液	1	3.23

表5。性别与结核耐药无相关性（*P* = 0.533），年龄 > 40岁组的氧氟沙星耐药率低于其余两组（*P* = 0.043）。结核初治组与复治组患者二线耐药率差异无统计学意义（*P* = 0.333），见表6。结核初治组CD4⁺ T细胞计数（68.73 ± 79.907 cells/μl）与结核复治组的CD4水平（30.80 ± 21.603 cells/μl）差异无统计学意义（*t* = 1.041，*P* = 0.307）。

三、耐药相关的基因突变

gyrA和gyrB是与氧氟沙星耐药相关的基因，8株耐氧氟沙星的菌株中，6株菌在gyrA基因发生了突变。1株菌在gyrB442位区发生了无义突变（CTG/CCG）。最常见的突变位点是gyrA94位（6/8，75%）。在其余的23株敏感株中，未检测到任何突变。与耐药表型相比，敏感性和特异性各为75%（6/8）和100%（23/23）。

12株卷曲霉素耐药菌株中有2株菌在rrs1401位发生了突变（A/G），其余10株耐药菌未检测到任何突变。此外，本研究观察到所有的临床菌株均在tlyA第11位碱基的突变（A/G）。在19株敏感菌株中未检测到任何突变。与耐药表型相比，敏感性和特异性各为16.67%（2/12），100%（19/19）。4株卡那霉素耐药菌中，2株菌在rrs1401位发生了突变（A/G），eis 基因未发现任

表4 31株结核分枝杆菌二线药物耐药特点

耐药情况	例数	百分比（%）
耐1种药物		
CM	6	19.35
OFX	1	3.23
KM	0	0.00
ETH	0	0.00
耐2种药物		
CM + KM	0	0.00
CM + OFX	3	9.68
KM + OFX	0	0.00
CM + ETH	0	0.00
KM + ETH	0	0.00
OFX + ETH	1	3.23
耐3种药物		
CM + KM + OFX	0	0.00
CM + KM + ETH	1	3.23
KM + OFX + ETH	1	3.23
CM + OFX + ETH	0	0.00
耐4种药物		
CM + OFX + KM + ETH	2	6.45

注：OFX：氧氟沙星；CM：卷曲霉素；KM：卡那霉素；ETH：

何突变位点。27株敏感菌均未检测到突变位点。与耐药表型相比,敏感性和特异性分别为50% (2/4)和100% (27/27)。

5株菌株对乙硫异烟胺耐药,耐药率为16.13%。在ethA位点检测到有1株菌发生突变。另外,在26株敏感菌株中,有3株菌株发生了突变。与耐药表型相比,敏感性和特异性为20% (1/5)和88.46% (23/26),详见表7。

表5 不同一线耐药模式下二线药物耐药比较 [例 (%)]

抗菌药物	一线敏感菌株 (n = 12)	一线耐药菌株 (n = 19)	P值
OFX	0 (0.00)	8 (42.11)	0.012
CM	2 (16.67)	8 (42.11)	0.240
KM	0 (0.00)	4 (21.05)	0.139
ETH	0 (0.00)	5 (26.32)	0.128

注: OFX: 氧氟沙星; CM: 卷曲霉素; KM: 卡那霉素; ETH: 乙硫异烟胺

讨 论

获得性免疫缺陷综合征是严重威胁人类健康的公共卫生问题;合并结核分枝杆菌感染后,两者相互作用,使得结核病变得更加复杂。研究表明^[7]当CD4⁺T细胞计数在(200~500)×10⁶/L时,患者的临床表现与单纯结核相似,比较典型;当CD4⁺T细胞计数在<200×10⁶/L时,结核病临床表现不典型,因此给诊断带来了困难。耐多药结核的出现增加了治疗的难度,氧氟沙星等二线药物是治疗耐多药结核的重要组成部分,了解二线药物的耐药特点对采取积极的治疗非常必要。本研究对AIDS-TB患者对结核分枝杆菌二线药物耐药特点及相关的分子生物学特征进行了分析。

本研究中血培养阳性结核例数最多,其次为淋巴结分泌物、痰培养。而3种标本同时检测可大大提高检测阳性率,达96.77%。提示在进行实验

表6 二线耐药相关的人口统计学和临床特点

一般资料	菌株数	耐药菌株数量							
		CM	P值	OFX	P值	KM	P值	ETH	P值
性别			1.000		0.550		1.000		1.000
男	28	11		8		4		5	
女	3	1		0		0		0	
年龄 (岁)			0.563		0.043		0.387		0.145
≤ 25	5	3		3		1		2	
25~40	17	6		5		3		3	
> 40	9	3		0		0		0	
一线抗结核药物的使用									
否	26	11	0.624	8	0.291	4	1.000	5	0.560
是	5	1		0		0		0	

注: OFX: 氧氟沙星; CM: 卷曲霉素; KM: 卡那霉素; ETH: 乙硫异烟胺

表7 二线药物耐药的基因特征

抗菌药物	位点	耐药株数量		敏感株数量		敏感性 (%)	特异性 (%)
		突变	无突变	突变	无突变		
OFX	gyrA94 (Asp/Gly)	4	4	0	23	50.0	100.00
	gyrA94 (Asp/Tyr)	1	7	0	23	12.50	100.00
	gyrA90 (Ala/Val)	1	7	0	23	12.50	100.00
	gyrB	0	8	0	23	0.00	100.00
KM	rrs1401 (A/G)	2	2	0	27	50.00	100.00
	eis	0	4	0	27	0.00	100.00
CM	rrs1401 (A/G)	2	10	0	19	16.67	100.00
ETH	ETHA44 (C/T)	1	4	0	26	20.00	100.00
	ETHA266 (Ser/Arg)	0	5	2	24	0.00	7.69
	ETHA371 (Gly/Cys)	0	5	1	25	0.00	3.85

注: OFX: 氧氟沙星; CM: 卷曲霉素; LM: 卡那霉素; ETH: 乙硫异烟胺

室检查时,需要采集不同类型的标本以提高检测的阳性率。

本研究中年龄>40岁组患者对氧氟沙星耐药率低于其余两组,可能与氧氟沙星耐药菌的增加有关,使年龄偏低的患者感染氧氟沙星耐药菌的可能性增加,也与年龄≤40岁组的人群流动性大,服药依从性差有关。鉴于本研究样本小,下一步应扩大样本量进一步证实。研究发现对一线抗结核药物耐药患者中氧氟沙星耐药率显著高于对一线药物敏感患者,与以往的研究一致^[8-9]。本研究发现,结核初治组与复治组患者的CD4水平无统计学差别,可能与本研究纳入人群的CD4水平普遍低有关。

卷曲霉素耐药与rrs和tlyA基因突变相关,尤其是rrs1401位(A/G)^[10]。本研究发现10株卷曲霉素耐药菌在这两个基因未发现任何突变,可能与未知耐药机制相关。此外,本研究发现在所有临床菌株中均存在tlyA基因第33位碱基的突变(A/G)。文献报道该碱基突变与卷曲霉素耐药不相关,仅作为一个自然界的多态性及遗传学的标志^[11]。多项研究表明卷曲霉素和卡那霉素之间存在交叉耐药^[12-15]。本研究发现3株菌同时耐卡那霉素和卷曲霉素,其中2株存在1401位(A/G)突变。因此,1401位(A/G)突变可以预测卡那霉素和卷曲霉素的交叉耐药。eis启动子区也是卡那霉素耐药相关的基因,最常见的突变位点是-10(G/A)和-14(C/T)^[16]。本研究未检测到eis启动子区的突变。可能与样本量少有关。此外,2株卡那霉素耐药菌株在rrs和eis启动子区未检测到任何突变,有可能与未知的耐药机制相关。

gyrA和gyrB是两个与氧氟沙星耐药相关的基因^[17-19]。本研究发现大多数的突变位于gyrA94位密码子(GAC/GGC),与Almeida等^[20]和Feuerriegel等^[21]等研究一致。本研究观察到gyrA95位的突变发生在所有的临床菌株中,该碱基突变仅作为自然界一种多态性^[11]。此外,gyrB基因的442位有一个无义突变(CTG/TTG)。1株耐药菌在gyrA和gyrB未发生任何突变,可能与其他未知的耐药机制相关。多项研究表明^[21-22],氧氟沙星耐药菌株中gyrA基因的突变比gyrB基因突变常见,与本研究结果一致。1 470 bp的ethA基因的开放读码区与乙硫异烟胺耐药相关^[6]。本研究中25%的乙硫异烟胺耐药菌株与ethA基因的突变相关(TCC/TTC)。另外3株耐药菌中未检测到突变。可能与其他基因相关^[6],

如ethR等。

与耐药表型相比,卷曲霉素、卡那霉素和氧氟沙星的敏感性均低于文献报道^[11,23],而特异性与一些地区报道一致^[21-22],但高于美国的研究^[11]。可能存在地域差异,另外本研究样本量少也会造成差异。研究表明,由于结核分枝杆菌的作用,与单纯HIV感染者相比,AIDS-TB患者CD4⁺T细胞数下降的程度更大^[24-25]。本研究发现83.87%的AIDS-TB患者CD4⁺T细胞<100 cells/L,与报道一致。

与单纯结核相比,本研究中二线药物总耐药率为48.39%,高于湖南^[26](11.1%)和中国东南部边远地区^[9](26.4%)的二线药物耐药率。研究报道单纯结核患者中广泛耐药结核在耐多药结核中比例由6.5%^[27]至20%^[28]不等,与本研究(14.29%)一致。与单纯结核中MDR-TB患者相比,本研究MDR-TB中氧氟沙星耐药率高于中国湖南^[26]和俄罗斯^[29]的研究,但是低于中国河南省^[30];卷曲霉素耐药率高于Zhao等^[31]研究,低于河南省^[30]研究。本研究MDR-TB中卡那霉素和乙硫异烟胺耐药率均高于湖南^[26]和卢旺达^[32]的研究数据,但与赵冰等^[33]研究结果接近。与单纯结核一线耐药菌株中二线药物耐药情况相比,本研究一线耐药菌株中C、K、O耐药率低于唐山^[34]的研究结果数据,高于中东部地区^[9]和上海^[35]的数据。出现上述现象可能因为存在耐药的地域性差异,本研究样本量小也可能造成偏倚。

本研究中存在一些不足之处,如纳入的研究例数太少,导致研究结果可能存在偏倚,因此,下一步研究计划扩大样本量,使之更有说服力。而且有些耐药机制尚未明确,需要检测整个基因序列来进一步阐释。此外,关于结核分枝杆菌耐药是否与基因型有关需进一步探讨。

本研究发现AIDS合并TB患者对二线药物耐药率高达48.39%,特别是对卷曲霉素和氧氟沙星。值得注意的是,这些患者均未接受过任何二线药物治疗,因此,应该加强对二线药物耐药检测。固体药敏试验耗时长,而检测耐药相关的基因突变有利于快速了解结核分枝杆菌的耐药特点,从而及时采取有效的治疗措施。

参 考 文 献

- 1 Kawai V, Soto G, Gilman RH, et al. Tuberculosis mortality, drug resistance, and infectiousness in patients with and without HIV infection in Peru[J]. Am J Trop Med Hyg, 2006, 75(6):1027-1033.

- 2 Pereira M, Tripathy S, Inamdar V, et al. Drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* in seropositive and seronegative HIV-TB patients in Pune, India[J]. Indian J Med Res, 2005, 121(4): 235-239.
- 3 Gao GJ, Lian LL, Sun Y, et al. Drug resistance characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to four first-line antituberculous drugs from tuberculosis patients with AIDS in Beijing, China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2015, 45(2): 124-129.
- 4 Huard RC, de Oliveira Lazzarini LC, Butler WR, et al. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1637-1650.
- 5 WHO. Policy Guidance on TB drug susceptibility testing (DST) of second-line drugs[J]. WHO, Geneva. WHO/HTM/TB/2008392. 2008.
- 6 Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(12): 3799-3805.
- 7 熊建菁, 赵根明, 顾元祥. 结核病与艾滋病病毒感染的相互影响[J]. 中国性病艾滋病防治, 2002, 8(4): 251-253.
- 8 Wang JY, Lee LN, Lai HC, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates: associated genetic mutations and relationship to antimicrobial exposure[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 59(5): 860-865.
- 9 Hu Y, Hoffner S, Wu L, et al. Prevalence and genetic characterization of second-line drug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Rural China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(8): 3857-3863.
- 10 Sowajassatakul A, Prammananan T, Chaiprasert A, et al. Molecular characterization of amikacin, kanamycin and capreomycin resistance in M/XDR-TB strains isolated in Thailand[J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 165.
- 11 Sreevatsan, S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(18): 9869-9874.
- 12 Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(5): 2032-2041.
- 13 Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(8): 3192-3197.
- 14 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.
- 15 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[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5064-5068.
- 16 Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B, et al. Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase eis confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(47): 20004-20009.
- 17 Antonova OV, Gryadunov DA, Lapa SA, et al. Detection of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* genome determining resistance to fluoroquinolones by hybridization on biological microchips[J]. Bull Exp Biol Med, 2008, 145(1): 108-113.
- 18 Mokrousov I, Otten T, Manicheva O, et al. Molecular characterization of ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Russia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8): 2937-2939.
- 19 Von Groll A, Martin A, Jureen P, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(10): 4498-4500.
- 20 Almeida DSP, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(7): 1417-1430.
- 21 Feuerriegel S, Cox HS, Zarkua N, et al. Sequence analyses of just four genes to detect extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in multidrug-resistant tuberculosis patients undergoing treatment[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(8): 3353-3356.
- 22 Yuan X, Zhang T, Kawakami K, et al. Molecular characterization of multidrug- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2404-2413.
- 23 Poudel A, Nakajima C, Fukushima Y, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Nepal[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6): 2831-2836.
- 24 Bonecini-Almeida MG, Werneck-Barroso E, Carvalho PB, et al. Functional activity of alveolar and peripheral cells in patients with human acquired immunodeficiency syndrome and pulmonary tuberculosis[J]. Cell Immunol, 1998, 190(2): 112-120.
- 25 Wanchu A, Kuttiatt VS, Sharma A, et al. CD4 cell count recovery in HIV/TB co-infected patients versus TB uninfected HIV patients[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2010, 53(4): 745-749.
- 26 Zhao LL, Chen Y, Chen ZN, et al. Prevalence and molecular characteristics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Hunan, China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(6): 3475-3480.
- 27 Zhao M, Li X, Xu P, et al. Transmission of MDR and XDR tuberculosis in Shanghai, China[J]. PLoS One, 2009, 4(2): e4370.
- 28 Li X, Wang H, Jing H, et al. Population-based surveillance of extensively drug-resistant tuberculosis in Shandong Province, China[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2012, 16(5): 612-614.
- 29 Tounghousova OS, Mariandyshev AO, Bjune G, et al. Resistance of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from the Archangel oblast, Russia, to second-line anti-tuberculosis drugs[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24(3): 202-206.
- 30 张国龙, 杜长梅, 苍泽卓也, 等. 中日合作对河南省结核菌二线药物耐药监测研究[J]. 医药论坛杂志, 2005, 26(19): 14-16.
- 31 Zhao LL, Chen Y, Liu HC, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(4): 1997-2005.
- 32 Umubyeyi A, Riquits L, Shamputa IC, et al. Low levels of second-line drug resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Rwanda[J]. Int J Infect Dis, 2008, 12(2): 152-156.
- 33 赵冰, 宋媛媛, 逢宇, 等. 中国耐药结核分枝杆菌二线抗结核药物敏感性分析[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(10): 831-834.
- 34 刘茜, 冯福民, 王东, 等. 唐山地区耐药结核分枝杆菌广泛耐药情况的调查[J]. 现代预防医学, 2007, 34(24): 4728-4729.
- 35 沈鑫, 李静, 高谦, 等. 2009年上海市耐药肺结核患者二线抗结核药物耐药状况调查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(6): 451-453.

(收稿日期: 2015-04-27)

(本文编辑: 孙荣华)

张玲, 孙月, 陈勇, 等. 获得性免疫缺陷综合征合并结核病患者对结核分枝杆菌二线药物耐药特征分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2016, 10(2): 166-172.