

## 广西百色地区结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 的突变特征分析<sup>①</sup>

韦红玉<sup>1</sup>, 隆昕颖<sup>2</sup>, 凌俊<sup>3</sup>, 赵丽娟<sup>1</sup>②, 谢振锋<sup>1</sup>, 唐华英<sup>1</sup>, 韦连登<sup>1</sup>, 陈源红<sup>1</sup>, 覃艳春<sup>1</sup>

(1. 右江民族医学院病原生物学与免疫学教研室, 广西 百色 533000

E-mail: why-825@163.com;

2. 广西百色市疾病预防控制中心, 广西 百色 533000;

3. 广西百色市妇幼保健院, 广西 百色 533000)

**摘要:** **目的** 分析百色地区结核分枝杆菌(MTB)利福平耐药相关基因 rpoB 的突变特征。**方法** 收集128例结核病患者痰液标本,采用改良罗氏培养基分离培养结核分枝杆菌,绝对浓度法检测利福平耐药性,PCR技术检测耐药结核分枝杆菌 rpoB 基因序列并测序分析利福平耐药相关基因 rpoB 的突变特征。**结果** 分离培养获得98例 MTB,98例 MTB 出现36株利福平耐药,耐药率为36.73%,36株耐利福平菌株中有27株 rpoB 基因发生突变,基因突变率为75.00%,其中516位点突变率为3.70%(1/27),531位点突变率为59.26%(16/27),526位点突变率为29.63%(8/27),533位点突变率为7.41%(2/27)。突变热点依次为 rpoB531、rpoB526 和 rpoB533。**结论** 百色地区耐利福平结核分枝杆菌耐药性产生的主要分子机制是因为 rpoB 的基因发生突变。

**关键词:** 结核分枝杆菌;利福平;利福平耐药决定区;rpoB 基因

中图分类号: R378.91

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2014)05-0679-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2014.05.001

## Characteristics of rpoB gene mutation of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis in Baise city, Guangxi province

Wei Hongyu<sup>1</sup>, Long Xinying<sup>2</sup>, Ling Jun<sup>3</sup>, Zhao Lijuan<sup>1</sup>, Xie Zhenfeng<sup>1</sup>, Tang Huaying<sup>1</sup>,  
Wei Liandeng<sup>1</sup>, Chen Yuanhong<sup>1</sup>, Qin Yanchun<sup>1</sup>

(1. Department of Pathogenic Biology and Immunology, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: why-825@163.com;

2. Baise Center for Disease Control and Prevention, Baise 533000, Guangxi, China;

3. Baise Maternal and Child Health Hospital, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze rpoB gene mutation characteristics in rifampin-resistant related Mycobacterium tuberculosis (MTB) in Baise city. **Methods** The sputum specimens were collected from 128 patients with tuberculosis and then were cultured on modified Lowenstein-Jensen culture medium, the drug sensitivity of rifampin was detected by absolute concentration method, mutation patterns of rpoB genes were detected by PCR and sequencing. **Results** Ninety-eight MTB isolates were obtained from 128 MTB clinical strains, 36.73% (36/98) isolates were resistant to rifampin, 27 of 36 rifampin-resistance MTB (75.00%) isolates carried mutations in the rpoB gene, and 3.70% (1/27) isolates carried mutations in 516 site, 59.26% (16/27) isolates carried mutations in 531 site, 7.41% (2/27) isolates carried mutations in 533 site. The top 3 loci with high mutation frequency were rpoB531, rpoB526 and rpoB533. **Conclusion** The main mechanism of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis occurrence is caused by rpoB gene mutation in Mycobacterium tuberculosis in Baise city.

**Key words:** Mycobacterium tuberculosis; rifampin; rifampin resistance determining region; rpoB gene

结核病是由结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, MTB)引起的慢性传染病,我国仍是22个结核病高负担国家之

① 基金项目:国家自然科学基金项目(81160535);广西高等学校科研项目(201204LX323)

② 通讯作者,E-mail:zhaolijuanxk@163.com

一。近年来,我国每年报告肺结核发病人数约 100 万,导致结核病高发病率和死亡率的重要因素之一是耐药结核病的产生,耐药肺结核有以下 4 种类型,单耐药(mono-resistance):仅对 1 种抗结核药物耐药;多耐药(poly-resistance):对 1 种以上的抗结核药物耐药(不包括同时对异烟肼和利福平耐药的情况);耐药多药(Multidrug resistance, MDR):至少对异烟肼和利福平同时耐药;广泛耐药(Extensively drug-resistant, XDR):除对异烟肼和利福平耐药之外,同时对任意 1 种氟喹诺酮类药物及对 3 种二线抗结核药物注射剂(卡那霉素、丁胺卡那霉素和卷曲霉素)中的至少 1 种耐药<sup>[1]</sup>。目前耐药肺结核危害日益凸显,每年新发患者人数约 12 万,未来数年内可能出现以耐药菌为主的态势。因此耐药结核病一直都是临床治疗的难点和基础研究热点<sup>[2]</sup>。近年来世界各地结核分枝杆菌的多耐菌株逐渐增多,甚至引起暴发流行。利福平是传统的抗结核一线药物,结核分枝杆菌对利福平的耐药机制可能是,编码 RNA 聚合酶 beta 亚基的 rpoB 基因的突变使利福平不能与之结合,从而产生对利福平的耐药<sup>[3]</sup>。目前很多预测利福平耐药的分子检测方法已经建立起来<sup>[4-5]</sup>,以往研究<sup>[6-9]</sup>显示单耐利福平菌株的 rpoB 基因突变多分布在“利福平耐药决定区”(rifampin resistance determining region, RRDR),507-533 位密码子,共 81 bp。

本研究拟了解百色地区耐利福平结核分枝杆菌临床分离株 rpoB 基因 RRDR 突变特征及其与耐药的关系。为本地区耐药结核的防治和制订有效的预防及干预耐药结核病措施提供参考依据。

## 1 材料与与方法

1.1 菌株来源 收集 2013 年在百色市疾病预防控制中心结核病防治所就诊的结核病痰液涂片阳性 128 例患者(包括百色市及百色地区各县新发和复发患者,年龄 19~88 岁;男 96 例,女 32 例)的痰标本。

### 1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌培养及耐药性检测 痰液涂片阳性细菌采用改良的罗氏培养基分离培养,培养阳性的菌株采用绝对浓度法进行耐药性检测。

1.2.2 基因组 DNA 提取和 rpoB 基因 RRDR 的 PCR 扩增和测序 基因组 DNA 采用北京 andybio 公司生产的分枝杆菌 DNA 提取试剂盒(柱式)提取,rpoB 基因扩增引物为 rpoB-F: 5'-TACGGTTCGGCAGCTGATCC-3', rpoB-R: 5'-TACGGCGTTTCGATGAACC-3'<sup>[10]</sup>(引物由华大基因公司合成),序列大小为 411 bp。PCR 扩增采用 50  $\mu$ l 反应体系:5  $\mu$ l 模板,上下游引物各 1.5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ l, 2 $\times$  EasyTaq PCR SuperMix 25  $\mu$ l(购自北京全式金生物公司)。扩增程序为:95  $^{\circ}$ C 变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,58.5  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min;循环 30 次,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 DNA 序列测定与分析 PCR 产物交由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。用 BLAST 与 H37RV 菌株相应基因进行序列比对,通过 DNAMAN 软件判断突变基因突变位点及形式。

## 2 结果

2.1 分离培养结果 从 128 例痰液涂片阳性标本中分离培养获得 98 例 MTB 菌株,36 株对利福平耐药。

2.2 PCR 检测结果 提取耐药菌株 DNA 进行 PCR,PCR 扩增产物与目的片段大小一致,部分 PCR 产物电泳图谱见图 1。

2.3 测序比对结果 36 株耐药菌株中,27 株在 rpoB“RRDR”区域出现突变,突变位点有 4 个,rpoB 单个突变位点突变特征,

见表 1。

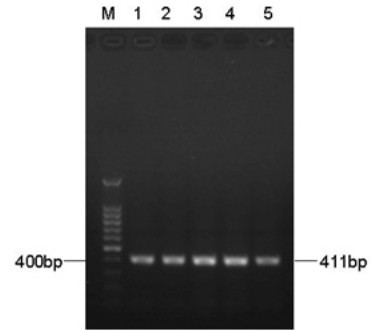


图 1 耐药菌株 PCR 产物电泳图

M:100bp DNA Marker; 1:H37RV; 2~5:部分耐利福平菌株 PCR 产物

表 1 rpoB 突变位点突变特征

密码子位点	密码子改变	氨基酸改变	突变菌株(n)	突变率(%)
rpoB516	GAC→TAC	Asp→Tyr	1	3.70(1/27)
rpoB526	CAC→TAC	His→Tyr	8	29.63(8/27)
rpoB531	TCG→TTG	Ser→Leu	16	59.26(16/27)
rpoB533	CTG→CCG	Leu→Pro	2	7.41(2/27)

## 3 讨论

耐利福平 MTB rpoB 基因突变主要发生在“RRDR”,以 531、526、516 位突变最为多见。已有文献报道我国北京市等 8 个地区 MTB rpoB 基因突变情况<sup>[11-12]</sup>,而百色地区尚未见类似报道。本研究检测结核病患者痰标本 rpoB 基因 RRDR 突变及其性质,为在我地区建立快速检测耐利福平结核病基因诊断技术奠定基础。

本实验 98 例 MTB 出现 36 株利福平耐药,耐药率为 36.73%,检测耐药菌 rpoB 基因序列,36 株耐利福平菌株中有 27 株 rpoB 基因发生突变,基因突变率为 75.00%,与贵州省遵义地区 rpoB 基因突变率相似<sup>[11]</sup>,其中 516 位点突变率为 3.70%(1/27),531 位点突变率为 59.26%(16/27),526 位点突变率为 29.63%(8/27),533 位点突变率为 7.41%(2/27)。与常规药敏实验相符。531 位点突变率与东部地区 rpoB531 突变频率(61.2%)<sup>[13]</sup>及中部地区 rpoB531 突变频率(58%)<sup>[14]</sup>研究结果相近,该研究中较高的 rpoB531 突变频率也可能是由于耐药菌株对于 rpoB531 的选择压力造成的<sup>[15]</sup>。有报道,531 位和 526 位是最常见的突变位点,且 531 多于 526<sup>[16]</sup>,与本地区的 rpoB 基因突变结果一致,但也有报道,526 位突变频率高于 531 位突变频率<sup>[3,17]</sup>,另本实验未出现已报道的 522、550、511、513 突变位点,说明 rpoB 基因突变位点在我国有一定的地域差异。本实验说明百色地区耐利福平结核分枝杆菌耐药性的产生主要是因为 rpoB 的 531 位点密码子发生改变,其次是 526 位点密码子发生改变,与苏州市、广东省、河南省等地突变特征相似<sup>[10,18-19]</sup>,进一步阐明利福平耐药机制主要与基因突变有关,特别是与 531 位点突变相关。9 株未发生突变与常规药敏实验不符,说明利福平耐药性的产生可能还有其它耐药机制或常规药敏实验也有误差,或是患者对 MTB 发挥免疫防御过程中患者自身遗传易感性及免疫系统稳态的打破使机体不能清除 MTB 而导致耐药<sup>[20]</sup>。

总之,本研究首次采用 DNA 序列测定技术分析百色地区结核分枝杆菌耐利福平 rpoB 基因的突变特征,为开发结核分

枝杆菌耐药性分子检测方法和阐明 MTB 利福平耐药机制积累了实验数据。

#### 参考文献:

- [1] World Health Organization. Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB): recommendations for prevention and control[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2006, 81(45): 430-432.
- [2] 崔振玲. 广泛耐药结核病现状及研究进展[C]. 首届中国临床微生物学大会(宁波会议)暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛论文集, 2010: 219-223.
- [3] 肖和平, 唐神结. 耐药结核病防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [4] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005.
- [5] Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 229.
- [6] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(11): 1320.
- [7] Riska PF, Jacobs WR Jr, Alland D. Molecular determinants of drug resistance in tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2000, 4(2): S4.
- [8] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update[J]. Tuberc Lung Dis, 1998, 79(1): 3.
- [9] Miller LP, Crawford JT, Shinnick TM. The rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38(4): 805.
- [10] 许蕴怡, 谭耀驹, 曾少芳, 等. 广东地区临床分离结核分枝杆菌 KatG, rpoB, rpsL 耐药基因变异研究[J]. 中国处方药, 2012, 10(3): 41-44.
- [11] 甘辛, 陈玲, 王建华, 等. 结核分枝杆菌耐利福平 rpoB 基因突变的序列分析[J]. 基础医学与临床, 2010, 30(3): 268-271.
- [12] 包洪, 于庭, 印璞, 等. 中国部分地区结核分枝杆菌耐利福平、异烟肼和链霉素耐药基因的检测[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(2): 232-234.
- [13] Luo T, Zhao M, Li X, et al. Selection of mutations to detect multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in Shanghai, China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(3): 1075.
- [14] Zhang SL, Qi H, Qiu DL, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from central China[J]. Biochem Genet, 2007, 45(3/4): 281.
- [15] Gagneux S, Long CD, Small PM, et al. The competitive cost of antibiotic resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Science, 2006, 312(5782): 1944.
- [16] Wu Xueqiong, Zhang Junxian, Chao Lixue, et al. Identification of rifampin-resistant genotypes in Mycobacterium tuberculosis by PCR-reverse dot blot hybridization [J]. Mol Biotechnol, 2009, 41(1): 1-7.
- [17] Pozzi G, Meloni M, Iona E, et al. rpoB mutations in multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis isolated in Italy[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 1197.
- [18] 张建平, 沈兴华, 王霞芳, 等. 苏州市耐利福平结核分枝杆菌 rpoB 基因突变特点的研究[J]. 中华疾病控制杂志 2012, 16(4): 293-296.
- [19] 赵玉玲, 杨洪毅, 马晓光, 等. 河南省耐多药结核分枝杆菌利福平耐药基因 rpoB 的突变特征[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2012, 47(2): 166-169.
- [20] 秦欢, 罗军敏. 结核分枝杆菌耐药机制研究新进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(8): 759-761.

收稿日期: 2014-07-15; 修回日期: 2014-08-22

读者·作者·编者

## ●本刊对统计学符号及统计学方法的要求

统计学符号按 GB 3358-1982《统计学名词及符号》的有关规定一律采取斜体排印, 常用: 1. 算术平均数用英文小写  $\bar{x}$  (中位数用  $M$ ); 2. 标准差用英文小写  $s$ ; 3. 标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$ ; 4.  $t$  检验用英文小写  $t$ ; 5.  $F$  检验用英文大写  $F$ ; 6. 卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ ; 7. 相关系数用英文小写  $r$ ; 8. 概率用英文大写  $P$  ( $P$  值前应给出具体检验值, 如  $t$  值、 $\chi^2$  值、 $q$  值等),  $p$  值应给出实际数值, 不宜用大于或小于表示, 而用等于表示。