

结核分枝杆菌环丝氨酸药物敏感性及耐药机制研究

牛金霞^{1,2}, 崔振玲³, 逢文慧⁴, 朱长太², 范琳³

摘要:目的 检测耐多药结核病(MDR-TB)临床分离株的环丝氨酸最低抑菌浓度(MIC),并从基因水平进行环丝氨酸耐药机制的研究,为环丝氨酸的快速耐药测定提供理论依据。方法 采用Middlebrook 7H9液体培养基,在96孔板中对140株MDR-TB和37株敏感结核分枝杆菌(MTB)临床分离株进行环丝氨酸药敏试验,筛选出对环丝氨酸耐药及敏感的菌株,再对Ald、Alr、ddlA基因进行突变位点及基因表达量的分析。结果 MDR-TB对环丝氨酸的耐药率仅为4.28%,初步将MIC≥32 μg/mL的结核分枝杆菌菌株判定为对环丝氨酸耐药;Ald、Alr、ddlA基因位点突变与结核分枝杆菌对环丝氨酸耐药无明显相关性,环丝氨酸耐药菌株在Alr基因位点处基因表达量明显高于敏感菌株。结论 目前临床的MDR-TB患者对环丝氨酸的耐药率较低,使用环丝氨酸治疗MDR-TB是一种有效的选择。尚未发现明确的环丝氨酸耐药突变位点,但Alr基因的过表达与MTB环丝氨酸耐药高度相关,可能是其耐药的新机制。

关键词:环丝氨酸;药敏试验;耐多药结核分枝杆菌;广泛耐药结核分枝杆菌;耐药机制

中图分类号:S855.1 文献标识码:A 文章编号:1002-2694(2019)01-0039-06

Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility and drug resistance mechanism to cycloserine

NIU Jin-xia^{1,2}, CUI Zhen-ling³, PANG Wen-hui⁴, ZHU Chang-tai², FAN Lin³

(1. Shanghai Ocean University, College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai 201306, China;

2. Department of Transfusion, Shanghai Jiao Tong University Affiliated

Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China;

3. Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine,

Shanghai Key Laboratory of Tuberculosis Shanghai 200433, China;

4. China Ocean University, College of Environmental Science and Engineering, Qingdao 266100, China)

Abstract: To detect the minimum inhibitory concentration of (MIC) circulating serine in clinical isolates of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), we studied the resistance mechanism of the genotypes of cycloserine-resistance *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), and provide the scientific evidence for the rapid resistance determination of cycloserine. The 140 clinical strains of drug-resistant *M. tuberculosis* and 37 clinical strains of drug-susceptible *M. tuberculosis* were isolated and tested by Middlebrook 7H9 liquid medium in 96-well plate. The Ald, Alr and ddlA mutations and gene expression levels were analysed to define the mechanism of cycloserine-resistant *M. tuberculosis*. The results showed cycloserine-resistance rates were

上海市科委资助课题(No.14411966500)

通讯作者:范琳,Email:fanlinsj@163.com;

ORCID:0000-0002-9411-496X

朱长太,Email:zct101@163.com;

ORCID:0000-0002-5250-1937

作者单位:1. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306;

2. 上海交通大学附属第六人民医院输血科,上海 200233;

3. 同济大学附属上海市肺科医院,结核病临床研究中心,上海市结核病(肺)重点实验室,上海 200433;

4. 中国海洋大学环境科学与工程学院,青岛 266100

as low as 4.28% in 140 strains of drug-resistant *M. tuberculosis*, we preliminarily defined the MICs of *M. tuberculosis* $\geq 32 \mu\text{g}/\text{mL}$ as cycloserine-resistance. There were no significant correlations between Ald, Alr, ddlA gene mutations and cycloserine-resistant *M. tuberculosis*. The Alr gene expression levels in cycloserine-resistant *M. tuberculosis* were significantly higher than those in cycloserine-susceptible *M. tuberculosis*. It is indicated that the drug resistance rate of cycloserine is low in MDR-TB, suggesting that cycloserine can be an effective and reliable clinical choice for treatment on MDR-TB. The cycloserine-resistance mutation in MTB has not been found, yet

the overexpression of *Alr* gene found to be highly related to the cycloserine-resistance of MTB, providing a possible explanation of MTB resistance mechanism.

Keywords: cycloserine; drug sensitivity testing; MDR-MTB; XDR-MTB; drug-resistant mechanism

Supported by the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality in China (No. 14411966500)

Corresponding authors: Fan Lin, Email: fanlingsj@163.com; Zhu Chang-tai, Email: zct101@163.com

耐药结核病是造成结核病疫情居高不下的主要因素之一,MDR-TB(耐多药结核病)及 XDR-TB(广泛耐药结核病)的治疗是控制耐药结核病的关键。环丝氨酸(Cycloserine, Cs),1982 年就被美国 FDA 批准上市,其抗结核分枝杆菌的作用弱于异烟肼及链霉素,世界卫生组织最新的耐药结核病治疗指南^[1]将环丝氨酸列入治疗 MDR-TB 的核心药物之一。根据国内外已有的报道提示结核分枝杆菌对环丝氨酸的耐药率较低^[2-5],然而近年来,随着指南的出台及耐药结核病疫情的控制压力,国内外使用环丝氨酸的病例在逐步增多,却仍然缺乏可靠的环丝氨酸的药敏实验方法,也缺乏目前流行的结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)对该药的耐药情况的了解。因此,本研究通过一定数量的 MTB 临床分离株的药敏试验,了解 MDR-TB 及 XDR-TB 临床分离株对环丝氨酸的耐药情况,为未来有效的优化抗结核方案提供可靠的依据。目前国际上对环丝氨酸采取的药敏方法大都是以罗氏固体培养基为基础的绝对浓度法和比例法^[2-5],该培养基的制作需要加热^[6],药物存在着一定程度的损失,因此,本研究选取 Middlebrook 7H9 液体培养基,在 96 孔板中建立液体药敏实验方法,根据对 140 株耐药 MTB 临床分离株及 37 株全敏 MTB 临床分离株的 MIC 结果,寻找判定 MTB 对环丝氨酸耐药的临界值。

在环丝氨酸耐药机制的研究中,环丝氨酸可能起作用的靶标基因点为 *Ald*、*Alr*、*ddIA*,由于目前研究耐药机制的方法都是将基因克隆、转化到大肠杆菌中进行研究^[7-8],并非针对来自临床的环丝氨酸耐药的分离菌株进行研究,因此,本研究通过上述的液体药敏法从临床病人的痰标本 MTB 分离株中筛选出环丝氨酸耐药的菌株,并随机抽取对环丝氨酸敏感的菌株,与 H37Rv 标准株一起,提取 DNA 和 RNA,针对 *Ald*、*Alr*、*ddIA* 基因点设计引物,分别进行 PCR 基因扩增及 Real-time PCR 扩增,分析对环丝氨酸耐药株有无明确的基因突变或有无基因表达量的变化,为建立环丝氨酸耐药的快速分子检测方法提供理论依据。

1 材 料

1.1 菌株来源 结核分枝杆菌标准株(H37Rv ATCC27294)购自国家菌种保藏中心,177 株 MTB 临床分离株来自上海市肺科医院结核科收治的患者,其中 100 株 MDR-TB、40 株 XDR-TB 及 37 株全敏 MTB 临床分离株。肺结核病的诊断遵循中华医学会结核病分会制定的《肺结核诊断和治疗指南标准》。对临床标本判断是否耐药的实验室药敏方法为 BACTEC MGIT 960 法,MDR-TB 指体外药敏实验证实至少同时对异烟肼和利福平耐药的 MTB, XDR-TB 指体外药敏实验证实至少同时对异烟肼和利福平耐药外,还对任何氟喹诺酮类药物耐药,以及 3 种二线注射类药物(卷曲霉素、卡那霉素和阿米卡星)中的至少 1 种耐药的结核病。全敏 MTB 是指使用 BACTEC MGIT 960 法检测对所有检测的药物(异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、氧氟沙星、卷曲霉素、阿米卡星)均敏感^[9]。

1.2 主要试剂与仪器 环丝氨酸药物、吐温-80 购自美国 Sigma 公司;药敏培养基所用的药物 Middlebrook 7H9 Broth、Middlebrook OADC Enrichment 均购自美国 Becton, Dickinson and Company;结核分枝杆菌的分离培养中所用的营养增菌液参考《结核病诊断实验室检验规程》^[6]于实验室中自制;注射用青霉素钠购自华北制药股份有限公司;GNP—92700 隔水式培养箱购自上海精宏实验设备有限公司。

2 方 法

2.1 试剂配置 液体培养基的配置:向 270 mL Middlebrook 7H9 液体培养基中加 30 mL Middlebrook OADC Enrichment、750 μL 5% 的吐温-80、加入青霉素使其终浓度为 100 单位/mL。药物配制:环丝氨酸用上述液体培养基配制,然后用 0.22 μm 无菌滤器(美国 Millipore 公司)过滤除菌,分装保存于-70 °C,实验前将含环丝氨酸的液体培养基加入 96 孔 U 型培养板中,每孔 100 μL,将配好的药敏板置于 37 °C 恒温培养箱过夜,若没有污染,则可进行下一步实验。

