

## 利福霉素耐药结核分枝杆菌 *rpoB* 突变与利福布丁耐药水平的关系

胡族琼, 蔡杏珊, 罗春明, 谭耀驹

(广州市胸科医院, 广东 广州 510095)

**[摘要]** **目的** 研究利福霉素耐药结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变与利福布丁耐药水平的相关性。**方法** 倍比稀释法测定 64 株利福霉素耐药及 6 株敏感菌株对利福布丁的最低抑菌浓度(MIC), 并分析其对异烟肼的耐药情况。同时对 *rpoB* 全基因扩增后测序, 分析 *rpoB* 突变位点和突变性质与利福布丁 MICs 高低及多重耐药的关系。**结果** 6 株敏感株 *rpoB* 未突变, MICs 为 0.25~0.50 mg/L。64 株耐药株 *rpoB* 突变率为 100%。37 株利福布丁高度耐药(MICs $\geq$ 4 mg/L)株中, S531L 突变 27 株, H526R 突变和 Y389C 突变各 2 株, S531W、H526Y、Q513K、V176F、D516Y 联合 Q253R 突变与 D516G 联合 L511P 突变各 1 株。17 株中度耐药(MICs 2~4 mg/L)株中, S531L 突变 16 株, D516G 联合 L511P 和 S509R 突变 1 株。10 株低度耐药(MICs 0.25~1 mg/L)株中, L533P、H526L、H526S、D516V、D516Y 单点突变各 2 株。93.75%(60/64)的利福霉素耐药株对异烟肼耐药。**结论** 检测 *rpoB* 突变即可初步筛选多重耐药结核分枝杆菌; 中、高水平利福布丁耐药株以 S531L 突变占绝对优势, *rpoB* 突变位点及突变类型与利福布丁耐药水平有一定相关性。

**[关键词]** 结核分枝杆菌; 抗药性, 微生物; 利福布丁; 利福霉素; *rpoB* 基因; 突变; 序列分析

**[中图分类号]** R378.91<sup>+</sup>1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)06-0401-04

## Relationship between the mutations in *rpoB* gene and the level of rifabutin resistance of rifamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

HU Zhu-qiong, CAI Xing-shan, LUO Chun-ming, TAN Yao-ju (Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the relationship between the mutations in *rpoB* gene of rifamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) and the level of rifabutin resistance. **Methods** The minimal inhibition concentrations(MICs) of 64 rifamycin-resistant isolates and 6 sensitive isolates of *M. tuberculosis* to rifabutin were determined by the dilution method, their isonicotinyl hydrazide (INH) resistance were analyzed. The whole *rpoB* gene were amplified and sequenced, then the relationship between the mutations in *rpoB* gene and the level of rifabutin resistance and multidrug resistance were analyzed. **Results** The sensitive isolates had no mutations in *rpoB* gene and their MICs were 0.25 mg/L - 0.50 mg/L. All rifamycin-resistant isolates had mutations in *rpoB* gene. Among 37 high-level rifabutin-resistant strains (MICs $\geq$ 4 mg/L), mutations of S531L, H526R, and Y389C were found in 27, 2 and 2 isolates respectively, co-mutation of S531W, H526Y, Q513K, V176F, D516Y and Q253R was in 1 strain, co-mutation of D516G and L511P was in 1 strain. Of 17 intermediated-level rifabutin-resistant strains (MICs 2 - 4 mg/L), 16 isolates were with S531L mutation and 1 with D516G combined with L511P and S509R mutation, respectively. Of 10 low-level rifabutin-resistant strains (MICs 0.25 - 1 mg/L), single mutation of L533P, H526L, H526S, D516V, and D516Y were found in 2 isolates respectively. 93.75%(60/64) of rifamycin-resistant isolates were also resistant to INH. **Conclusion** Detection of *rpoB* mutation can preliminarily screen multidrug-resistant *M. tuberculosis*; The predominant mutations of *rpoB* gene in high- and middle-level rifabutin-resistant isolates are S531L, the mutation positions and types of *rpoB* gene in *M. tuberculosis* correlates with the level of rifabutin resistance.

[收稿日期] 2011-10-12

[基金项目] 国家“十一五”重大专项(2008Z×10003-009)

[作者简介] 胡族琼(1974-),女(汉族),重庆市人,主治医师,主要从事细菌耐药及致病机制研究。

[通讯作者] 谭耀驹 E-mail:gzchtan@163.com

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance, microbial; rifabutin; rifamycin; *rpoB* gene; mutation; sequence analysis

[Chin Infect Control, 2011, 10(6): 401-404]

耐多药结核分枝杆菌(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)的广泛存在<sup>[1]</sup>,使利福平的抗结核疗效大受影响,世界卫生组织(WHO)因此推荐了一系列新药或一线药物替代品用于治疗 MDR-TB<sup>[2]</sup>,其中包括利福布丁(rifabutin)。利福布丁为含有螺哌嗪基的利福霉素衍生物,对结核分枝杆菌的体外抗菌活性是利福平的 2~4 倍。其作用机制与利福平相同,可与结核分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 多聚酶  $\beta$  亚基(*rpoB*)稳定结合,抑制该酶活性,从而抑制结核分枝杆菌 RNA 合成。

耐药程度对于临床制定治疗方案极其重要,了解结核分枝杆菌耐药程度最好的方法是进行最低抑菌浓度(MIC)检测,而 MIC 目前尚不具备临床实施条件。因此,有研究者对结核分枝杆菌临床分离株耐药程度与常规药敏结果之间的关系进行研究<sup>[3]</sup>,但耐药程度与耐药基因突变关系的研究不多,特别是 *rpoB* 基因突变与利福布丁耐药程度关系的研究鲜有报道<sup>[4]</sup>。了解 *rpoB* 基因突变特征与利福布丁耐药水平的关系,可为快速制定合理应用利福布丁的治疗方案提供依据。本研究通过测定已知利福平和利福布丁不同耐药表型结核分枝杆菌临床分离株的 MICs 值及其 *rpoB* 全基因序列突变特征,探讨 *rpoB* 基因突变与利福布丁耐药水平的关系,现报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 菌株来源 70 株结核分枝杆菌临床株分离自本院 2009 年 12 月—2010 年 5 月住院和门诊肺结核患者,其耐药表型是采用比例法在本研究之前已测定好的。包括利福平/利福布丁耐药株 54 株,利福平耐药/利福布丁敏感株 10 株,两者均敏感株 6 株。其中 60 株为异烟肼耐药,10 株为异烟肼敏感。1 株 H37Rv 作为对照,由本科室保存。

1.2 利福布丁 MIC 值测定 倍比稀释法测定所有菌株对利福布丁的 MIC 值。用 5 mL 二甲基甲酰胺和 14.50 mL 水溶解 25 mg 利福布丁(购自 sigma 公司),配制成 1 282  $\mu\text{L}/\text{mL}$  浓度的存储液。取 2 mL 该溶液至 18 mL 7H9 肉汤中,稀释成 128  $\mu\text{L}/\text{mL}$  工作液备用。将培养好的新鲜菌落研磨后,用 7H9 肉汤稀释至  $6 \times 10^6$  CFU/mL。在 96 孔板的第

1 孔与第 3—12 孔中加入 100  $\mu\text{L}$  7H9 肉汤。取上述配制好的药液 200  $\mu\text{L}$  至第 2 孔,混匀后吸 100  $\mu\text{L}$  至第 3 孔,直至第 11 孔混匀后弃去 100  $\mu\text{L}$  混匀液,第 12 孔作无药无菌对照。药物浓度依次为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.50、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。加入 100  $\mu\text{L}$  菌液至第 1—11 孔中混匀。封板后置 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 7 d,读取 MIC 值。对低度耐药株和敏感株进行继续稀释,测定 MIC 值。结果见表 1。

1.3 *rpoB* 基因序列测定 根据 GenBank (GenBank No. BX842574.1)提供的结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的 *rpoB* 全基因序列,利用软件 Primer PREMIER Version 5.0 (www.PremierBiosoft.com)设计引物 F1 和 F4。引物序列分别如下,F1: 5'-ACAAAATTATCGCGCGAAC-3'; F4: 5'-CCGTCCTTCTCCGGCTTAAGCG-3',由上海生物工程公司合成。采用 GenoLyse VER 1.0 (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany)试剂盒提取 DNA。聚合酶链反应(PCR)扩增,采用 TaKaRa LA Taq with GC Buffer 试剂盒。PCR 反应体系分别由 0.25  $\mu\text{L}$  PrimerSTAR HSPolymerase (TaKaRa)、5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PrimerSTAR buffer (TaKaRa)、8  $\mu\text{L}$  2.50 mmol/L dNTP mixture (TaKaRa)、0.50  $\mu\text{L}$  F1 (20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、0.50  $\mu\text{L}$  F4 (20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )、31  $\mu\text{L}$  灭菌水、5  $\mu\text{L}$  DNA 模板组成。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ ,变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ ,55 s,60 $^{\circ}\text{C}$ ,55 s,72 $^{\circ}\text{C}$ ,1.5 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。PCR 产物涵盖 *rpoB* 全基因,全长 3 782 bp。产物经琼脂糖凝胶电泳后送华大公司测序。公司先对 PCR 产物纯化后再测序。测序数据通过 ClustalX 分析,分析结果见表 1。

## 2 结果

2.1 利福布丁对所有菌株的 MICs 值 利福布丁对 H37Rv 与 6 株敏感菌株的 MICs 值为 0.25~0.50 mg/L;对利福平耐药/利福布丁敏感株的 MICs 值为 0.25~1 mg/L;对利福平/利福布丁耐药菌株的 MICs 值均  $\geq 2$  mg/L,其中 MICs  $\geq 4$  mg/L 的菌株最常见(37 株),最高水平 MICs  $\geq 32$  mg/L (5 株)。详见表 1。

2.2 *rpoB* 突变频率和氨基酸替换类型 H37Rv 与所有敏感株 *rpoB* 基因未见突变;所有利福霉素耐药株 *rpoB* 基因都发生突变,其中 531 位点突变最常见,其突变频率为 68.75% (44/64),但以

S531L 突变为氨基酸主要替换类型。发现 1 株新型单突变 S531W 突变株;发现 2 株新型单突变 Y389C 突变株和 1 株稀有突变 V176F 突变株,且都是高水平利福布丁耐药。其余突变情况见表 1。

表 1 各菌株 MICs 值、*rpoB* 突变情况及其耐药谱

Table 1 The MICs, *rpoB* mutation and resistance spectrum of all bacterial isolates

No. of isolates	MIC(mg/L)	<i>rpoB</i> mutation	RIF	RBU	INH
3	≥32	S531L	R	R	R
1	≥32	H526R	R	R	R
1	≥32	Q513K	R	R	R
1	≥16	S531L	R	R	S
1	≥16	H526Y	R	R	R
1	≥16	H526R	R	R	R
2	≥16	Y389C	R	R	R
1	≥16	V176F	R	R	R
6	≥8	S531L	R	R	5R, 1S
1	≥4	S531W	R	R	S
1	≥4	D516Y, Q253R	R	R	S
17	≥4	S531L	R	R	R
1	≥4	D516G, L511P	R	R	R
16	≥2	S531L, D516G	R	R	R
1	≥2	L511P, S509R	R	R	R
2	≥0.25	H526L	R	S	R
2	≥0.25	H526S	R	S	R
2	≥0.50	L533P	R	S	R
2	≥0.25	D516V	R	S	R
2	≥0.25	D516Y	R	S	R
6	≥0.125	no mutation	S	S	S

R; Resistant; S; Sensitive

2.3 突变位点和突变类型与利福布丁耐药水平间的关系 37 株利福布丁高度耐药 (MICs ≥4 mg/L) 株中, S531L 突变 27 株, H526R 突变和 Y389C 突变各 2 株, S531W、H526Y、Q513K、V176F、D516Y 联合 Q253R 突变与 D516G 联合 L511P 突变各 1 株。17 株中度耐药 (MICs 2~4 mg/L) 株中, S531L 突变 16 株, D516G 联合 L511P 和 S509R 突变 1 株。10 株利福平耐药/利福布丁敏感 (MICs 0.25~1 mg/L) 株中, L533P、H526L、H526S、D516V、D516Y 单点突变各 2 株。6 株敏感株 (MICs 0.25~0.50 mg/L) *rpoB* 基因未突变。

### 3 讨论

本研究结果发现,所有对利福霉素耐药的结核分枝杆菌临床分离株 *rpoB* 基因都发生突变,而所有敏感株及标准株 H37Rv *rpoB* 基因不发生突变。该研究结果再次证实了利福平和利福布丁耐药都与

*rpoB* 基因突变有关的研究结论<sup>[5]</sup>。耐药谱分析发现,本地区利福霉素耐药株中 90% 以上都对异烟肼耐药,略高于庞茂银等<sup>[6]</sup>报道的结果,但异烟肼耐药与利福布丁耐药水平可能无关。

为了得到全面的突变信息,科学分析 *rpoB* 位点突变与利福霉素耐药表型及利福布丁耐药水平的关系,本研究采用了 *rpoB* 全基因序列测定。其中 531 位点突变最常见,在利福霉素耐药株中的突变频率为 68.75%,但在利福霉素耐药/利福布丁敏感株中未见 531 突变。H526Y 和 H526R 突变只出现在利福平/利福布丁耐药株中,而 H526L 和 H526S 突变只发生在利福平耐药/利福布丁敏感株中,提示同一突变位点的氨基酸替换类型不同可能影响利福布丁的耐药表型。3 株利福平/利福布丁耐药株在 *rpoB* 基因起始端存在单点突变,该结果与香港学者 Siu 等<sup>[7]</sup>的研究结果相似,推测该区域可能也是利福霉素除利福平耐药决定区之外的另一个利福霉素耐药相关区域。

了解结核分枝杆菌耐药程度最好的方法是进行 MIC 检测,因此,本研究用测定利福布丁 MIC 值来了解结核分枝杆菌对利福布丁的耐药程度。本研究中对利福布丁耐药水平的划分是依据国外学者研究结果<sup>[4]</sup>而定。在 MICs $\geq 4$  mg/L 的利福布丁高度耐药株中,以 S531L 单突变为主,占高度耐药株的 72.97%(27/37),其余位点散在分布,突变频率[分别为 2.70%(1/37)和 5.41%(2/37)]显著低于 S531L 突变( $\chi^2$  分别为 38.84、35.44,均  $P = 0.00$ )。在 MICs 为 2~4 mg/L 的利福布丁中度耐药株中,也是以 S531L 单突变为主,占中度耐药株的 94.12%(16/17),其余位点突变频率(5.88%,1/17)显著低于 S531L 突变( $\chi^2 = 26.47, P = 0.00$ )。以上结果提示,利福布丁中、高度耐药可能主要与 S531L 突变有关,该结果与 Cavusoglu 等<sup>[4]</sup>的研究结果相符。同一突变位点的氨基酸替换类型不同,可能导致利福布丁耐药水平不同。本研究中, H526Y 和 H526R 单突变株利福布丁 MICs $\geq 16$  mg/L,而 H526L 和 H526S 单突变株利福布丁 MICs 为 0.25~1 mg/L,提示 H526Y 和 H526R 突变可能与利福布丁高度耐药有关,而 H526L 和 H526S 单突变可能仅导致利福布丁低度耐药,因而其常规药敏结果也可能为敏感。MICs $\geq 4$  mg/L 的利福布丁高水平耐药株中,有 1 株 Q253R 与 D516Y 联合突变株,但 D516Y 单突变株 MICs 为 0.25~0.50 mg/L,推测位于 *rpoB* 基因起始端的 Q253R 突变在利福布丁高水平耐药中可能发挥了重要作用。而 MICs $\geq 16$  mg/L 的利福布丁高水平耐药株中,也有 Y389C 单突变 2 株, V176F 单突变 1 株,因此推测 *rpoB* 基因起始端区域突变可能与利福布丁高水平耐药有关。

总之,本地区分离的结核分枝杆菌中,90%以上的利福霉素耐药株都对异烟肼耐药,而利福霉素耐药株的 *rpoB* 基因突变率为 100%,因此通过利福霉素耐药表型或单独检测 *rpoB* 突变可初步筛选多重

耐药结核分枝杆菌。S531L 单突变在中、高水平利福布丁耐药株中的高频率发生,提示 S531L 突变可能与利福布丁中、高水平耐药有关。而同一突变位点氨基酸替换类型不同可能导致利福布丁耐药水平不同的现象或可提示 *rpoB* 突变位点及突变类型与利福布丁耐药水平有一定相关性。因此,分析 *rpoB* 基因突变特征对预测利福布丁耐药水平有帮助。

#### [参考文献]

- [1] World Health Organization. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB), 2010 global report on surveillance and response[EB/OL]. (2010-03)[2011-07]. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599191_eng.pdf).
- [2] World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. Emergency update 2008[EB/OL]. (2008-04)[2011-07]. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547581\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547581_eng.pdf).
- [3] 崔振玲,王洁,陆俊梅,等. 结核分枝杆菌临床分离株药敏结果与耐药程度的关联分析[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(12):1145-1149.
- [4] Cavusoglu C, Karaca-Derici Y, Bilgic A. In-vitro activity of rifabutin against rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10(7):662-665.
- [5] Williams D L, Spring L, Collins L, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42(7):1853-1857.
- [6] 庞茂银,张文宏,陈澍,等. 结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变与多重耐药及利福平耐药程度的相关性[J]. 复旦学报(医学版), 2004, 31(3):228-230,238.
- [7] Siu G K H, Zhang Y, Lau T C K, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(9): 730-733.

欢迎登录《中国感染控制杂志》网站: [www.zggrkz.com](http://www.zggrkz.com)

敬请注册、浏览、赐稿