

# 结核分枝杆菌二线抗结核药物耐药分子机制研究进展

胡彦<sup>1,2</sup>, 刘洁<sup>1</sup>, 杨春<sup>2</sup>

1. 重庆市结核病防治所结核病参比实验室, 重庆 400050; 2. 重庆医科大学病原生物学教研室

**摘要:** 耐药尤其是耐多药结核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) 的出现, 在许多国家已成为重大的公共卫生问题。我国是全球 27 个耐多药结核病高负担国家之一, 耐多药结核病和广泛耐药结核病 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB) 已经成为我国结核病疫情控制的主要障碍。二线抗结核药物是治疗耐多药结核病的主要药物, 充分了解二线抗结核药物的耐药分子机制可以为建立简便、快速的二线抗结核药物耐药性检测方法 & 研发新的抗结核药物提供分子生物学依据, 对阻止耐多药结核病的进一步传播有重大意义。近年来, 二线抗结核药物耐药分子机制研究取得了很大进展, 本文就此进行了综述。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 耐药机制; 分子机制; 基因突变

**中图分类号:** R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)11-1405-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.11.037

## Progress on molecular mechanism of drug resistance of second-line antituberculosis agents in *Mycobacterium tuberculosis*

HU Yan\*, LIU Jie, YANG Chun

\* Tuberculosis Reference Laboratory, Chongqing Institute for Tuberculosis Control and Prevention, Chongqing 400050, China

**Abstract:** The emergence of resistance to antituberculosis drugs, particularly the multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), has become a major public health problem in many countries. China as one of 27 high-burden countries with MDR-TB around the world, MDR-TB and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) become the primary factors to hamper TB control. Second-line anti-tuberculosis agents are the major drugs for the treatment of MDR-TB. A thorough understanding of molecular mechanism of drug resistance of second-line anti-tuberculosis agents can establish a simple and rapid method for detecting the drug resistance of second-line anti-tuberculosis agents and provide a biomolecular basis for developing new anti-tuberculosis drugs, and it is of great value to prevent the further spread of MDR-TB. This paper reviews the great advances in the molecular mechanism of drug resistance of second-line anti-tuberculosis agents in recent years.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance mechanism; molecular mechanism; gene mutation

耐多药结核病 (multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB), 是指至少对利福平和异烟肼同时耐药的结核分枝杆菌引起的结核病; 广泛耐药结核病 (extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB), 即在 MDR-TB 基础上, 对任何一种氟喹诺酮类药物耐药且至少对一种二线抗结核注射剂 (卷曲霉素、卡那霉素和阿米卡星) 耐药。据 2007-2008 年全国结核病耐药性基线调查报告显示, 我国涂阳肺结核耐多药率为 8.32%, 广泛耐药率为 0.68%<sup>[1]</sup>。MDR-TB 和 XDR-TB 已经成为我国结核病疫情控制的主要障碍, 进一步加剧了对我国公共卫生的威胁。二线抗结核药物是治

疗 MDR-TB 的主要药物, MDR-TB 患者若治疗不当, 就可能进一步发展成为 XDR-TB, 使患者面临或处于无药可治的窘境。早期、准确、快速的抗结核药物敏感性试验可以为临床科学的治疗提供可靠依据。由于传统药敏试验耗时长, 分子快速检测是未来的方向, 充分了解二线抗结核药物的耐药分子机制, 对于建立简便、快速的二线抗结核药物耐药性检测方法 & 研发新的抗结核药物有重大意义, 可以帮助患者尽早制订有效的化疗方案, 阻止耐多药结核病的进一步传播。

目前, 结核分枝杆菌的耐药机制主要包括细胞壁通透性改变、药物外排泵及药物作用靶标相关基因突变等。其中, 结核分枝杆菌基因组上编码药物靶标的基因或药物活性有关的酶基因突变, 是结核分枝杆菌产生耐药性的主要分子机制。现将常见二线抗结核药物耐药分子机制, 尤其是药物作用靶标相关基因突变

**基金项目:** 重庆市卫生计生委医学科研项目 (2016MSXM106)

**作者简介:** 胡彦 (1982-), 女, 重庆人, 硕士在读, 主要从事结核分枝杆菌实验室诊断相关工作。

**通信作者:** 杨春, E-mail: yangchunim@163.com。

所致的耐药机制综述如下。

### 1 氟喹诺酮类药物 (fluoroquinolones, FQs)

FQs 是重要的二线抗结核药物,目前已应用于各类耐药结核病的治疗,特别对一线药物如异烟肼、利福平不敏感的 MDR-TB,有良好的效果<sup>[2]</sup>。目前,用于结核病治疗的 FQs 主要有氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、环丙沙星、加替沙星和司帕沙星等。FQs 主要作用于细菌的 DNA 旋转酶,使细菌 DNA 复制受阻,从而导致细菌死亡。DNA 旋转酶是由两个 A 亚单位 (*gyrA*) 和两个 B 亚单位 (*gyrB*) 组成的四聚体,分别由 *gyrA* 和 *gyrB* 基因编码。细菌 *gyrA* 和/或 *gyrB* 基因上有一段核苷酸序列与喹诺酮耐药性密切相关,称为喹诺酮耐药决定区 (QRDR),即 *gyrA* 基因的 74-113 位氨基酸<sup>[3-4]</sup>, *gyrB* 基因的第 461-499<sup>[3]</sup>/500-538<sup>[4]</sup> 位氨基酸,QRDR 碱基的改变引起相应的 DNA 旋转酶改变,从而导致结核分枝杆菌耐药。

很多报道显示结核分枝杆菌 *gyrA* 基因中 QRDR 区的突变与喹诺酮耐药密切相关,是耐药的主要原因,临床结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变率为 50%~93.3% 不等<sup>[5-9]</sup>,差异可能来源于菌株样本的选择及样本量的大小。*gyrA* 基因突变位点主要发生在 90、91 和 94 位密码子<sup>[5-9]</sup>,其他突变位点还有 70 位<sup>[8,11]</sup>、74 位<sup>[9-11]</sup>、80 位<sup>[11]</sup>、88 位<sup>[7,11-12]</sup>、89 位<sup>[7,9,11]</sup>、95 位点突变为天然多态现象,与耐药关系不大<sup>[10,13]</sup>。FQs 耐药株中 *gyrB* 基因发生突变较少见,突变率为 1.6%~5.1%<sup>[7-9,11]</sup>,*gyrB* 基因突变与 FQs 耐药性的关系有待进一步研究。另外,*gyrA* 基因双突变或者 *gyrA* 加上 *gyrB* 基因同时突变常意味着高水平耐药<sup>[7,14-15]</sup>。此外,对于一些不存在 *gyrA* 和/或 *gyrB* 基因 QRDR 区发生突变的氟喹诺酮耐药株,也可能存在其他耐药机制,如细胞膜渗透性降低和药物外排泵等<sup>[16]</sup>,常引起低水平耐药。

### 2 卡那霉素 (kanamycin, Km)/阿米卡星 (amikacin, Am)

氨基糖苷类抗生素是高效、广谱抗生素,是最常用的抗感染药物,大部分氨基糖苷类抗生素具有预期的药物动力学特性,而且与其它抗生素具有协同作用,使其成为治疗危及生命感染的优良品种。氨基糖苷类 Km 以及它的衍生物 Am 的抑菌机制主要是与核糖体结合,通过阻碍氨基酸的进位,影响蛋白质的合成和释放,从而引发细菌死亡。已有研究表明,氨基糖苷类药物是通过修饰 16S rRNA 的核糖体小体结构抑制蛋白

质合成,氨基糖苷类药物耐药的产生与 16S rRNA 编码基因 *rrs* 突变相关,*rrs* 基因突变为目前已知引起 Km/Am 耐药的主要机制,其中最常见突变是 1401 位 A→G 点突变,可以作为高度耐药的一个重要标识<sup>[17-21]</sup>。而在 Km 和 Am 敏感菌株中未检出此突变,提示 *rrs* 基因 A1401G 突变是结核分枝杆菌对 Km 和 Am 交叉耐药的分子基础<sup>[17,20-22]</sup>。*rrs* 基因其他比较常见的突变还有 C1402T、G1484T,主要发生在高水平耐药株<sup>[18,20,22]</sup>。报道<sup>[17]</sup>显示 Km、Am 耐药株 *rrs* 基因突变位点还有 A514C、C517T、C1443G 和 T1521C,但与耐药无关。而报道<sup>[21]</sup>显示 C517T 突变与低水平耐药有关。另外,Km 耐药株 *rrs* 基因突变率为 57.7%~78.9%<sup>[18-19,22-24]</sup>,Am 耐药株 *rrs* 基因突变率为 70%~90%<sup>[22,24]</sup>,上述研究结果不同的原因可能与各地区流行菌株的基因学差异及表型和基因型检测方法不同有关,需要进一步进行研究验证。除了 *rrs* 基因,*eis* 基因启动子区点突变与氨基糖苷类药物低浓度耐药相关<sup>[25]</sup>。*eis* 基因编码的 Eis 蛋白是一种氨基糖苷乙酰转移酶,参与氨基糖苷类药物的乙酰化过程。*eis* 基因启动子的点突变导致 *eis* 基因转录水平上升,使得 Eis 蛋白表达水平和氨基糖苷类药物乙酰化的显著上升,从而导致氨基糖苷类药物失去活性。文献报道氨基糖苷类药物耐药的临床菌株中 *eis* 启动子突变频率在 20%~30% 之间<sup>[19,22,24]</sup>,也有报道高达 79%<sup>[25]</sup>,突变位点主要为 G(-10)A、C(-14)T<sup>[19,22,24]</sup>,其它突变还有 G(-37)T、C(-12)T、G(-10)C、G(-6)T、C(-15)G<sup>[22,25]</sup>。

### 3 卷曲霉素 (capreomycin, Cm)

虽然 Cm 属于多肽类药物,但其作用机制与氨基糖苷类药物相似<sup>[26]</sup>。Cm 耐药性的产生一般基于以下 3 种原因:一是编码 16S rRNA 的 *rrs* 基因发生突变。有 A1401G、C1402T、G1484T 等位点突变,临床菌株中以 A1401G 突变最常见,且这种突变菌株多数对 Cm 呈中低水平耐药,部分突变菌株对 Cm 仍敏感<sup>[17,22,27]</sup>,Cm 对部分含有 A1401G 突变敏感菌株的 MIC 值高于多数野生型敏感菌株,A1401G 突变是 Km、Am 与 Cm 部分交叉耐药的分子基础<sup>[17,20-22,27]</sup>;C1402T、G1484T 位点突变可导致结核分枝杆菌对 Cm 高度耐药,C1402T 突变与 Km、Cm 和紫霉素 (viomycin, Vm) 交叉耐药有关,G1484T 突变导致 Km、Am、Cm 和 Vm 同时耐药<sup>[20]</sup>。二是编码 rRNA 修饰酶的 *tlvA* 基因突变,*tlvA* 基因突变可导致 Cm 低水平耐药<sup>[21]</sup>。编码 rRNA 修饰酶-2'-O-甲基转移酶的 *tlvA* 基因突变是 Cm 耐

药性产生的重要原因,它的突变使得 rRNA 无法被甲基化,影响了核糖体功能,从而导致 Cm 耐药的产生。rRNA 甲基转移酶在螺旋结构 44 修饰 16S rRNA 上的核苷 C1409,在螺旋结构 69 修饰 23S rRNA 的核苷 C1920<sup>[26-27]</sup>。*tlyA* 基因突变不会引起 Km、Am 耐药,但可引起 Cm 和 Vm 交叉耐药<sup>[27]</sup>。三是结核分枝杆菌本身存在的药物作用靶标发生改变。

#### 4 乙硫异烟胺 (ethionamide, Eto)/丙硫异烟胺 (prothionamide, Pto)

Eto 是异烟酸的衍生物,结构与异烟肼相似,其抑菌机制主要为抑制分枝菌酸合成从而发挥抗菌作用。Eto 是药物前体,与靶细胞结合前均需被氧化激活<sup>[28-31]</sup>。目前对于 Eto 耐药分子机制的研究主要关注于 *ethA* 基因、*ethR* 基因、*inhA* 基因及其调控序列,此外还有 *ndh* 基因、*mshA* 基因。

Eto 是药物前体,其进入体内首先由 *ethA* 基因编码的单加氧酶 EthA 蛋白激活,*ethA* 基因发生突变会阻碍 Eto 与酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)结合,导致细菌耐药<sup>[30-31]</sup>。EthA 蛋白的表达受 *ethR* 基因编码的 EthR 转录阻遏蛋白负性调节,*ethR* 基因突变,也将导致 Eto 耐药<sup>[28,32]</sup>。*inhA* 基因及其调控序列也是 Eto 耐药的主要分子机制。Eto 与异烟肼的分子靶标相同,都是作用于 *inhA* 基因编码的 II 型脂肪酸生物合成的烯酰基乙酰载体蛋白(enoyl-ACP)还原酶 InhA,抑制分枝菌酸的合成从而发挥抗菌作用<sup>[33-34]</sup>。此外,Eto 耐药还与 *ndh*、*mshA* 基因突变有关。II 型 NADH 脱氢酶由 *ndh* 基因编码,调控 NADH/NAD<sup>+</sup> 的比例,*ndh* 基因突变引起酶活性缺失,细胞中 NADH/NAD<sup>+</sup> 比例升高,导致 ETH-NAD 结合障碍而产生耐药<sup>[35-36]</sup>。*mshA* 基因编码糖基化转移酶,与分枝菌酸合成有关,其突变导致 Eto 活化障碍<sup>[37]</sup>。

文献报道,在 Eto 耐药株中,*ethA* 基因突变率为 37%<sup>[29]</sup>、47%<sup>[32]</sup>; *ethR* 基因突变频率低于 10%<sup>[32]</sup>; *inhA* 基因及其调控序列突变率分别为 22%、66%<sup>[29]</sup>; *inhA* 基因及其启动子区突变率为 62%<sup>[32]</sup>。在 Eto 耐药的 MDR-TB 菌株中,*ethA*、*mshA*、*ndh*、*inhA* 基因及启动子区基因突变率分别为 72%、45.6%、8.7%、33.3%<sup>[38]</sup>。另外,与异烟肼耐药相关的 *KatG* 基因突变与 Eto 耐药无关<sup>[29]</sup>,Eto 与异烟肼的交叉耐药与 *inhA* 基因及启动子区突变有关<sup>[38]</sup>。

Pto 的结构和活性与 Eto 几乎相同,而对于 Pto 耐药分子机制的研究报道较少见,文献<sup>[39]</sup>对 74 株结核分枝杆菌复合群进行了 *inhA* 和 *mshA* 基因测序,但认

为这 2 个基因的多态性与 Pto 耐药无关。

#### 5 对氨基水杨酸(p-aminosalicylic acid, PAS)

PAS 是一种前药,其作用机制仍不完全明确,主要作用机制为抑制结核分枝杆菌叶酸代谢<sup>[40-41]</sup>。叶酸代谢途径中的关键酶编码基因突变将导致结核分枝杆菌对 PAS 耐药。PAS 作为叶酸前体对氨基苯甲酸(PABA)的结构类似物,在细菌体内可以被二氢叶酸合成酶(DHPS, FolPI)和二氢叶酸合成酶(DHFS, FolC)“活化”,进而抑制二氢叶酸还原酶(DHFR, DfrA)的活性,从而阻断以叶酸为辅酶的代谢通路。编码 FolC 蛋白的 *folC* 基因突变会影响 PAS 在结核分枝杆菌体内的代谢,从而导致耐药产生。此外,由 *ribD* 基因编码的 RibD 蛋白作为二氢叶酸还原酶(DHFR/DfrA)的替代物,*ribD* 基因突变将导致 RibD 蛋白过度表达而使 PAS 耐药,其突变位点主要为启动子区 -11 位 G→A 突变<sup>[41-43]</sup>。结核分枝杆菌胸苷酸合成酶是 PAS 作用的重要靶位,PAS 作用于叶酸拮抗剂而发挥作用,编码胸苷酸合成酶的 *thyA* 基因发生突变导致胸苷酸合成酶活性减弱,从而导致耐药发生<sup>[44-45]</sup>。

张宗德等<sup>[46]</sup>报道了 36.4% (16/44) 的 PAS 临床耐药株检测到了 *thyA* 基因突变,突变类型包括置换、颠换、插入、缺失,均为单碱基改变或单碱基缺失,其中 2 株为 *thyA* 基因 2 个位点联合突变。Xiaobing Zhang 等<sup>[43]</sup>检测了 PAS 耐药相关的三个基因 *folC*、*thyA* 和 *ribD*, 61.1% 的菌株至少有一个基因发生突变,其中 116 株为单基因突变,11 株为双基因突变(*folC* 和 *thyA*、*folC* 和 *ribD*)。*folC* 基因突变率最高为 34.8%,其次为 *thyA* 和 *ribD* 基因,突变率分别为 26.0%、5.8%。大多数 *folC* 基因突变为氨基酸置换,涉及 5 个突变位点(40、43、49、150 和 153 位),其中以 43 位(I43A、I43T 和 I43S)突变最常见。54 株 *thyA* 基因突变株中,包含 19 个多态性位点及 5 个移码突变,最常见的突变为 H75N,有 17 株。

#### 6 环丝氨酸(cycloserine, Cs)

其抗菌作用机制是抑制细菌细胞壁粘肽的合成,使细胞壁缺损,耐酸能力减弱而起到杀菌或抑菌作用。细菌细胞壁主要结构成分是胞壁粘肽,由 N-乙酰葡萄糖胺(GNAc)和与五肽相连的 N-乙酰胞壁酸(MNAc)重复交替联结而成。胞浆内粘肽前体的形成可被 Cs 所阻碍,Cs 通过抑制 D-丙氨酸消旋酶(Alr)和合成酶(Ddl)而阻碍胞浆内粘肽前体 N-乙酰胞壁酸五肽的形成<sup>[47]</sup>。D-丙氨酸消旋酶(Alr)编码基因 *alr* 的过度



表达与 Cs 耐药相关。相对于 *alr* 基因,编码丙氨酸合成酶(Ddl)的 *ddl* 基因过表达水平相对较低。*alr* 和 *ddl* 同时过表达会使 Cs 耐药水平 8 倍升高<sup>[48]</sup>。文献<sup>[47]</sup>报道 *ald* 和 *alr* 基因突变与 Cs 耐药有关,*ald* 基因(Rv2780)编码丙氨酸脱氢酶,其突变导致丙氨酸脱氢酶功能障碍,具体机制尚不清楚<sup>[47]</sup>。另外,辅酶 Q 和甲基萘醌类代谢相关基因突变也可能与 Cs 耐药相关<sup>[49]</sup>。总之,结核分枝杆菌二线抗结核药物耐药的分子机制尚未被完全阐明,目前已报道的基因还不能用来解释所有菌株的耐药机制。由于不同研究者使用的分子生物学检测方法存在一定差异,尤其是检测的基因组覆盖范围不同,检测的是全基因序列还是耐药决定区序列等,都将对耐药基因突变特征结果产生影响。另外,对于药物外排泵及细胞壁通透性等方面在二线抗结核药物耐药性产生中的作用,也有待于深入研究。

#### 参考文献

- [1] Zhao Y, Xu S, Wang L, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23):2161-2170.
- [2] Berning SE. The role of fluoroquinolones in tuberculosis today[J]. Drugs, 2001, 61(1):9-18.
- [3] Piton J, Petrella S, Delarue M, et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase[J]. PLoS One, 2010, 5(8):e12245.
- [4] Devasia R, Blackman A, Eden S, et al. High proportion of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with novel gyrA polymorphisms and a gyrB region associated with fluoroquinolone susceptibility[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(4):1390-1396.
- [5] Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, et al. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* gyrA and gyrB genes and detection of quinolone resistance mutations[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38(4):773-780.
- [6] Huang TS, Kunin CM, Shin-Jung Lee S, et al. Trends in fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in a Taiwanese medical centre; 1995-2003[J]. J Antimicrob Chemother, 2005, 56(6):1058-1062.
- [7] Zhang Z, Lu J, Wang Y, et al. Prevalence and molecular characterization of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(1):364-369.
- [8] Yin X, Yu Z. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China[J]. J Infect, 2010, 61(2):150-154.
- [9] 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.
- [10] Shi R, Zhang J, Li C, et al. Emergence of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by gyrA mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(12):4566-4568.
- [11] Maruri F, Sterling TR, Kaiga AW, et al. A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and a proposed gyrase numbering system[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(4):819-831.
- [12] 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.
- [13] Almeida Da Silva PE, 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.
- [14] Kocagöz T, Hackbarth CJ, Unsai I, et al. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(8):1768-1774.
- [15] Sun Z, Zhang J, Zhang X, et al. Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(2):115-121.
- [16] De Rossi E, Afinsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question[J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(1):36-52.
- [17] 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.
- [18] Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, et al. Detection of kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(5):1220-1225.
- [19] 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 Ch, 2013, 57(8):3857-3863.
- [20] 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.
- [21] Zhang Z, Liu M, Wang Y, et al. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to kanamycin, amikacin, and capreomycin in China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014, 33(11):1959-1966.
- [22] Georgioudis SB, Magana M, Garfein RS, et al. Evaluation of genetic mutations associated with *Mycobacterium tuberculosis* resistance to amikacin, kanamycin and capreomycin: a systematic review[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33275.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Reeves AZ, 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 U S A, 2009, 106(47):20004-20009.
- [26] Johansen SK, Maus CE, Plikaytis BB, et al. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using tlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs[J]. Mol Cell, 2006, 23(2):173-182.
- [27] Engström A, Perskvist N, Werngren J, et al. Comparison of clinical isolates and *in vitro* selected mutants reveals that tlyA is not a sensitive genetic marker for capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(6):1247-1254.
- [28] Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria[J]. J Biol Chem, 2000, 275(36):28326-28331.
- [29] 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.
- [30] Vale N, Gomes P, Santos HA. Metabolism of the antituberculosis drug ethionamide[J]. Curr Drug Metab, 2013, 14(1):151-158.
- [31] Vilchère C, Jacobs WR Jr. Resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*: genes, mutations, and causalities[J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(4):MGM2-0014-2013.
- [32] Brossier F, Veziris N, Truffot-Pernot C, et al. Molecular investigation of resistance to the antituberculous drug ethionamide in multidrug-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(1):355-360.
- [33] Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Science, 1994, 263(5144):227-230.
- [34] Marrakchi H, Lanéelle G, Quémar A. *inhA*, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II[J]. Microbiology, 2000, 146(Pt2):289-296.
- [35] Vilchère C, Weisbrod TR, Chen B, et al. Altered NADH/NAD<sup>+</sup> ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(2):708-720.
- [36] Cardoso RF, Cardoso MA, Leite CQ, et al. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* i-

- solates from Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2007, 102(1): 59-61.
- [37] Vilch ze C, Av-Gay Y, Attarian R, et al. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Mol Microbiol, 2008, 69(5):1316-1329.
- [38] Rueda J, Realpe T, Mejia GI, et al. Genotypic analysis of genes associated with independent resistance and cross-resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(12):7805-7810.
- [39] Projahn M, K ser CU, Homolka S, et al. Polymorphisms in isoniazid and prothionamide resistance genes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(9): 4408-4411.
- [40] Minato Y, Thiede JM, Kordus SL, et al. *Mycobacterium tuberculosis* folate metabolism and the mechanistic basis for *para*-aminosalicylic acid susceptibility and resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9):5097-5106.
- [41] Zheng J, Rubin EJ, Bifani P, et al. *para*-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Biol Chem, 2013, 288(32):23447-23456.
- [42] Zhao F, Wang XD, Erber LN, et al. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to *para*-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(3): 1479-1487.
- [43] Zhang XB, Liu LG, Zhang Y, et al. Genetic determinants involved in *p*-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates from tuberculosis patients in northern China from 2006 to 2012 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(2):1320-1324.
- [44] Rengarajan J, Sasseti CM, Naroditskaya V, et al. The folate pathway is a target for resistance to the drug *para*-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria [J]. Mol Microbiol, 2004, 53(1):275-282.
- [45] Fivian-Hughes AS, Houghton J, Davis EO. *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate synthase gene *thyX* is essential and potentially bifunctional, while *thyA* deletion confers resistance to *p*-aminosalicylic acid [J]. Microbiology, 2012, 158(Pt 2):308-318.
- [46] Zhang ZD, Zhao YL, Li ZH, et al. Mutations in the thymidylate synthase gene is a major mechanism in the *para*-aminosalicylic acid resistance of *M. Tuberculosis* [J]. Chin J Tub Res Dis, 2007, 30(9): 683-685.
- [47] Desjardins CA, Cohen KA, Munsamy V, et al. Genomic and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* strains implicate *ald* in D-cycloserine resistance [J]. Nat Genet, 2016, 48(5):544-551.
- [48] Feng Z, Barletta RG. Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine: D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(1):283-291.
- [49] Hong W, Chen L, Xie J. Molecular basis underlying *Mycobacterium tuberculosis* D-cycloserine resistance. Is there a role for ubiquinone and menaquinone metabolic pathways? [J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(6):691-701.

收稿日期:2016-12-28

(接第 1392 页)

中检测到,但是在上呼吸道上皮细胞、支气管、细支气管、气管、脾脏的 T 细胞、脑神经细胞和胃肠道中仅有少量的表达,且禽流感病毒受体( $\alpha$ -2,3 唾液酸)数量随着支气管的往上分级逐渐减少。由此推断这可能是下呼吸道标本检测结果为阳性,上呼吸道标本检测结果为阴性的原因。为了提高检出率,建议对疑似禽流感病毒病例采集下呼吸道标本。

在实验中发现,利用两种核酸提取法检测 H5 亚型,仪器提取法扩增曲线较手工提取法扩增曲线结果典型。出现这种情况的原因分析可能为:1. 仪器磁珠法操作过程中不需要多次离心,能够实现提取与纯化一步完成,减少了人员操作流程。仪器磁珠法特地将分离技术和富集技术有机的结合为一体,大大地提高了分离过程中分子相互作用的动力学速度,达到自动化提取出高纯度 RNA 的目的。手工法提取 RNA,需要多次离心,操作繁琐,人为操作的不精准可导致结果的重复性存在偏差。这可能是仪器提取法的扩增曲线较手工法典型的原因之一。2. 手工法提取的下呼吸道标本比仪器法提取的下呼吸道标本在 4℃ 的外环境里多存放 3 h。在这段时间内,处于体外环境的人感染 H5N6 禽流感病毒发生降解,导致手工法的提取出的 RNA 浓度较上午仪器提取出的 RNA 浓度偏低,扩增曲线不明显。3. 实验室所用试剂对人感染 H5N6 禽流感病毒的检测灵敏度较低,导致两种方法的甲型流感病毒扩增曲线典型, H5 亚型扩增曲线不典型。

随后对确诊病例的连续实验室监测发现,6 月 1 日,6 月 3 日,6 月 6 日采集的三次标本扩增结果均为

阴性。提示规范用药之后,人感染 H5N6 禽流感病毒在体内可能被抑制。因此为了提高 H5N6 禽流感病毒检出率,对于可疑病例应尽量在用药前采集标本送检实验室。

世界卫生组织指出虽然甲型 H5N6 禽流感已在人间引起严重感染,但截止到目前人间病毒感染似为散发,没有出现人际传播且病例密切接触者保持健康。然而,正在确定这一病毒的特性,其对大流行性菌株的演变和出现所造成的影响尚不得而知<sup>[8]</sup>。因此,继续加强本州流感监测,包括对不明原因肺炎、严重急性呼吸道感染(SARI)实施监测,是早期发现和及时控制人感染高致病性禽流感疫情的关键,最终到达早治疗,改善患者存活率的目的。

#### 参考文献

- [1] Su S, Bi YH, Wong G, et al. Epidemiology, evolution, and recent outbreaks of Avian Influenza virus in China [J]. J Virol, 2015, 89(17): 8671-8676.
- [2] Heine HG, Foord AJ, Wang J, et al. Detection of highly pathogenic zoonotic influenza virus H5N6 by reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction [J]. Virol J, 2015, 12(1):1-4.
- [3] 何继波,段婧,郑艳,等.云南省首例人感染 H5N6 禽流感病例的临床与流行病学特征分析 [J]. 现代预防杂志, 2015, 42(21): 3852-3854.
- [4] Centers for Disease Control. Influenza type A viruses and subtypes [EB/OL]. (2015-02-09) [2016-07-03]. <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/influenza-a-virus-subtypes.htm>.
- [5] 涂文校,随海田,牟笛,等.2016 年 5 月全国突发公共卫生事件及需关注的传染病风险评估 [J]. 疾病监测, 2016, 31(5):356-359.
- [6] 高敏,崔大伟,杨先知,等.人感染高致病性 H5N6 禽流感病毒的分子生物学特征 [J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2):156-159.
- [7] Yao L, Korteweg C, Hsueh W, et al. Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues [J]. FASEB J, 2008, 22(3):733-740.
- [8] 世界卫生组织. 人感染甲型 H5N6 禽流感病毒—中国 [EB/OL]. (2016-06-08) [2016-07-03]. <http://www.who.int/csr/don/08-june-2016-ah5n6-china/zh/>.

收稿日期:2016-12-19