

· 老年人结核病专栏 ·

乙胺丁醇体外诱导结核分枝杆菌耐药性的实验研究

梁建琴*, 李洪敏, 王金河, 陈志, 冯士生, 杨海英

(解放军第309医院全军结核病研究所, 北京 100091)

【摘要】目的 研究乙胺丁醇(EMB)体外诱导结核分枝杆菌耐药性, 指导临床合理用药。方法 对结核分枝杆菌 H₃₇Rv 实施乙胺丁醇耐药性诱导试验, 对诱导菌株和 34 株耐药临床分离株进行聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP)和测序分析(DS)。结果 12 株耐药临床分离株和第 8 代 H₃₇Rv 诱导株的 PCR-SSCP 出现异常电泳图谱, DS 证实发生 embB306 ATG→GTG 突变。结论 长期间歇低浓度药物刺激能够诱导结核分枝杆菌获得性耐 EMB。

【关键词】分枝杆菌; 结核; 乙胺丁醇; 抗药性; 细菌

【中图分类号】 R378.91

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)02-0104-03

Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* induced by ethambutol *in vitro*

LIANG Jianqin*, LI Hongmin, WANG Jinhe, CHEN Zhi, FENG Shisheng, YANG Haiying

(Tuberculosis Research Institute, Chinese PLA 309th Hospital, Beijing 100091, China)

【Abstract】 Objective To study the drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* induced by ethambutol *in vitro*, and to guide the selection and use of anti-tuberculous agents in clinical practice. **Methods** The induced experiments of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv by ethambutol *in vitro* were performed. The induced strains and 34 ethambutol-resistant strains were analyzed by polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-direct sequencing (PCR-DS) techniques. **Results** The SSCP spectrum in 12 ethambutol-resistant strains and the induced strains of eighth generation was different from that of wild type H₃₇Rv. PCR-DS showed the mutation from ATG to GTG at codon 306 of embB. **Conclusion** The acquired ethambutol-resistance could be induced by long term exposure to the low level of intermittent antibacterial agents.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; ethambutol; drug resistance, bacterial

细菌耐药性监测对于了解本地区细菌耐药现状和发展趋势、指导临床合理使用抗生素具有重要意义。为此, 掌握细菌的某些特性及抗生素的相关知识, 如天然耐药性、耐药谱型、易产生选择性耐药的抗生素等, 对于如何解释药敏试验结果和监测数据分析至关重要。

乙胺丁醇(ethambutol, EMB)是1961年发现的一种具有抗分枝杆菌活性的合成药物, 和其他一线抗结核药物一样, 其在各地不同程度产生了耐药。耐药结核分枝杆菌急剧增多和广泛传播, 成为严重威胁人民健康的重要问题。因此, 应用不同药物浓度传代培养的诱导试验方法, 观察结核分枝杆菌产生耐 EMB 的过程, 对研究结核分枝杆菌的耐药机制有重要的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标准菌株及标本来源 34 例耐 EMB 临床分离

株来源于解放军第309医院全军结核病研究所结核科; H₃₇Rv 标准菌株购自中国药品生物制品检定所。

1.1.2 引物的设计与合成 由解放军第309医院全军结核病研究所设计, 上海生工生物工程有限公司合成。引物 SI(5'-CAAGTCGAACGGAAAGCT-3')和 SII(5'-CGTAA-TCGCAGTCCGAGT-3')可扩增分枝杆菌 16S rDNA 基因, 产生 272 bp 片段; 引物 E6(5'-CGCTGGACCAGTTGGA-3')和 E7(5'-CCAGCGG-AAATAGTTGG-3')可扩增结核分枝杆菌 embB 基因, 产生 258 bp 片段。

1.1.3 培养基的制备 7H10 琼脂培养基配成含药和不含药的两种培养基。含药培养基的浓度梯度分别为 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256mg/L。

1.2 方法

1.2.1 药物敏感性试验 按照《结核病诊断实验室检验规程》, 对 34 株临床分离株进行 EMB 耐药性

试验。EMB 耐药标准: 5 mg/L 和 50 mg/L 分别为低度和高度耐药。

1.2.2 直接诱导试验 将 $H_{37}Rv$ 菌研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支含药浓度为 0.5 mg/L 培养基中, 培养 3 周后, 将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支含药浓度为 1 mg/L 培养基中培养 3 周, 再将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支含药浓度为 2 mg/L 培养基中培养 3 周, 重复上述试验, 直至培养基中无菌生长为止, 记录观察结果。每次接种设 1 支不含药培养基作为对照管。

1.2.3 间接诱导试验 (1) 将 $H_{37}Rv$ 菌研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支含药浓度为 0.5 mg/L 培养基中, 培养 3 周后, 将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支不含药培养基中继续培养 3 周; (2) 再将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支含药浓度为 1 mg/L 培养基中, 培养 3 周后, 再将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支不含药培养基中继续培养 3 周; (3) 将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 再取 0.1 ml 分别接种在 5 支含药浓度为 2 mg/L 培养基中, 培养 3 周后, 将生长菌落研磨稀释至 10^{-2} g/L, 取 0.1 ml 分别接种在 5 支不含药培养基中继续培养 3 周; 重复上述试验, 直至培养基中无菌生长为止, 记录观察结果。每次接种设 1 支不含药培养基作为对照管。

1.2.4 DNA 提取及 PCR 扩增 采用传统方法^[1]提取标准株 $H_{37}Rv$ 、诱导菌株、临床分离株 DNA。在 25 μ l 反应体系内进行 PCR 扩增: 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ l, 引物终浓度均为 0.2 μ mol/L, TaqDNA 聚合酶 1 U, DNA 模板 10~20 ng, 加无菌水至 25 μ l。置 PCR 仪内 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min、58 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延长 8 min。2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.2.5 PCR-SSCP 初步菌种鉴定^[2] 8% (29:1)非变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳, 银染后观察结果。与结核分枝杆菌 $H_{37}Rv$ 图谱相同的为结核分枝杆菌, 不同的分离株为非结核分枝杆菌。

1.2.6 PCR-SSCP 分析 embB 基因 PCR 扩增产物在 8% (29:1)非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 银染后观察结果。与结核分枝杆菌 $H_{37}Rv$ 图谱相同的为 EMB 敏感菌株, 不同的菌株即可判定存在 embB 基因突变。

1.2.7 序列分析 引物 E6, 7 扩增 embB 基因产生 365 bp 片段。取 50 μ l 扩增产物 DNA, 送上海生物工程技术有限公司测序分析。

2 结果

2.1 药物敏感性试验

34 株临床分离株中, 低度耐药 18 例, 高度耐药

16 例。

2.2 诱导试验

直接诱导试验: 随着药物浓度的增加, 结核菌生长的菌落明显减少, 到 16 mg/L 时结核分枝杆菌全部死亡; 间接诱导试验: 在 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L 培养浓度时, 细菌生长量也相应减少, 但较直接诱导试验对应浓度细菌生长量丰富, 培养到 128 mg/L 浓度时, 只有极少量结核分枝杆菌生长, 到 256 mg/L 浓度时, 细菌全部死亡。

2.3 基因分析

2.3.1 PCR 扩增 以 16S rDNA 引物 SI 和 SII 扩增 34 株耐 EMB 临床分离株, 均产生 272 bp DNA 片段; 以引物 E6, 7 扩增 34 株耐 EMB 临床分离株和直接诱导试验 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/L 和间接诱导试验 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg/L 不同培养浓度 $H_{37}Rv$ 标准株的 embB 基因, 均产生清晰的 365 bp 片段, 间接诱导试验 128 mg/L 浓度时因极少量细菌生长, 未能提取到染色体 DNA。

2.3.2 分枝杆菌初步菌种鉴定 34 株临床分离株经 16S rRNA PCR-SSCP 初步菌种鉴定, 电泳图谱全部与 $H_{37}Rv$ 图谱相同, 鉴定为结核分枝杆菌复合群。

2.3.3 embB 基因 PCR-SSCP 分析 以结核分枝杆菌标准株 $H_{37}Rv$ 为对照, 对 34 株耐 EMB 临床分离株 embB 基因 365 bp 片段进行 SSCP 分析, 22 株耐药分离株和直接 0.5, 1, 2, 4, 8 mg/L、间接诱导试验 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg/L 培养浓度菌株的 SSCP 图谱与结核分枝杆菌标准株完全相同; 12 株临床分离株和间接诱导试验中 64 mg/L 培养浓度诱导株的 SSCP 图谱与结核分枝杆菌标准株 SSCP 图谱有明显差异, 判定为 embB 基因突变(图 1)。

图 1 embB 基因 PCR-SSCP 分析

A: 直接诱导试验 8 mg/L 培养浓度菌株; C: 间接诱导试验 16 mg/L 培养浓度菌株; F: 结核分枝杆菌标准株 $H_{37}Rv$; D, K: 耐 EMB 临床分离株, 图谱与 $H_{37}Rv$ 相同; B, H: 间接诱导试验 64 mg/L 培养浓度菌株; E, G, I, J: 耐 EMB 临床分离株, 图谱与 $H_{37}Rv$ 不同

2.3.4 PCR-DS 分析 对 34 株临床分离株和直接、间接诱导试验的不同培养浓度诱导株进行 PCR-DS 分析, 结果见表 1。

表 1 PCR-SSCP 和 PCR-DS 部分结果

EMB 传统药敏试验	PCR-SSCP	PCR-DS	菌株数
	embB	embB(codon306)	
R	-	ATG	22
R	+	ATG→GTG	8
R	+	ATG→CTG	1
R	+	ATG→ATA	2
R	+	ATG→ATT	1
直接诱导试验诱导株	-	ATG	25
间接诱导试验诱导株	-	ATG	35
64 mg/L 诱导株	+	ATG→GTG	5

注: +: PCR-SSCP 图谱与 H₃₇Rv 不一致; -: PCR-SSCP 图谱与 H₃₇Rv 一致; R: 耐药菌株

3 讨论

结核菌的耐药性分为两大类: 一是天然耐药, 是天然耐药菌的固有特性, 已知可预测; 二是获得性耐药, 是特指某些细菌具有的一种耐药特性。不能预测, 需要做药敏试验^[3]。在天然敏感菌中由于基因突变或获得一段基因片段, 使敏感菌基因型发生改变而产生耐药。与天然耐药不同, 获得性耐药不断在变化, 其变化频率常与抗生素应用有关。诱导试验进一步证实了结核分枝杆菌获得性耐药的可能性是存在的^[4,5]。

最近的研究表明^[6], 结核分枝杆菌耐 EMB 与阿拉伯糖基转移酶的编码基因 embABC 操纵子突变或 emb 蛋白过度表达有关, 其中 embB 基因(尤其是 306 位密码子)突变是耐 EMB 产生的主要原因。

直接诱导试验中随着 EMB 浓度的增加, 结核分枝杆菌生长明显减少, 直至细菌全部死亡, 所以结核分枝杆菌很少发生基因突变。直接诱导试验的最小抑菌浓度为 8 mg/L, 与 H₃₇Rv 的低度耐药水平 5 mg/L 很接近, PCR-SSCP 和直接测序证明其没有发生 embB306 基因突变, 直接诱导的菌株还是否存在其它耐药机制, 有待下一步研究证实。间接诱导试验结果提示, 结核分枝杆菌受到 EMB 攻击后, 部分死亡, 还有一部分结核菌改变了细胞的特性生存下来, 待稳定一段时间后, 又开始快速增长。当经第二次高浓度 EMB 攻击后, 变异的结核分枝杆菌又开始了第二次的改变, 以此反复螺旋式上升, 变异的结核分枝杆菌在不断的刺激后, 又不断的修复和改变, 最终在第 8 次传代 64 mg/L 浓度时, 5 株全部出现 embB306 ATG→GTG 突变; 但为什么发生突变后的耐药菌株不能选择性地生存下来, 而在 256 μg/ml 时全部死亡? 一方面说明大剂量抗生素可以杀死耐药菌; 另一方面, 是否还存在其它机制有待进一步探讨, 如细菌间

横向传递机制、代谢物的积累等导致细菌表面结构和性质发生改变而不利于细菌生长或中毒死亡。实验结果表明, 结核分枝杆菌在体外长期接受抗菌药物的压力, 可诱导结核分枝杆菌基因突变而产生耐药性, 其突变位点与临床耐药株突变位点一致, 这不仅从分子水平证明了抗菌药物作用下生长的菌株为耐药菌株, 而且也说明临床耐药株的产生和传播与抗结核药物的使用密切相关。结核分枝杆菌的耐药性是复杂的, 本文只对结核菌 embB306 位点进行初步分析, 34 株耐药分离株中, 只有 12 株出现 embB306 位点突变, 存在四种突变类型, 可能与耐药水平有关^[6-8]。另 22 株未发现分析部位突变, 可能存在其他的耐药机制^[9,10], 尚需进一步研究。

本研究通过体外诱导试验证实了结核分枝杆菌可在间歇小剂量接触抗结核药物后产生耐药性, 形成耐药菌株。在临床治疗过程中, 滥用抗结核药物是引起细菌耐药性产生的主要原因之一, 因此要坚持早期、规律、适量、全程、联合的治疗原则, 耐药结核病是可以控制的。

【参考文献】

- [1] 张敦熔. 现代结核病学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 96-98.
- [2] 吴雪琼, 王晋洪, 张俊仙, 等. PCR-SSCP 分枝杆菌菌种初步鉴定方法的建立及其应用[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(7): 25-26.
- [3] 中国防痨协会. 《结核病诊断实验室检验规程》[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 8-45.
- [4] 刘贵建, 许淑珍, 马纪平, 等. 多步法抗菌药物诱导性肠球菌耐药的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(6): 601-604.
- [5] 陈妍, 罗予, 毛理. 氟喹诺酮类药物体外诱导肺炎克雷伯菌耐药后 GyrA 和 ParC 的变异[J]. 中国微生物学杂志, 2009, 21(2): 145-148.
- [6] Starks AM, Gumusboga A, Plikaytis BB, et al. Mutations at embB codon 306 are an important molecular indicator of ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(3): 1061-1066.
- [7] Srivastava S, Ayyagari A, Dhole TN, et al. emb nucleotide polymorphisms and the role of embB306 mutations in Mycobacterium tuberculosis resistance to ethambutol[J]. Int J Med Microbiol, 2009, 299(4): 269-280.
- [8] Ramaswamy S, Amin AG, Goksel S, et al. Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2): 326-336.
- [9] Jaber AA, Ahmad S, Mokaddas E. Minor contribution of mutations at iniA codon 501 and embC-embA intergenic region in ethambutol-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Kuwait[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2009, 8(1): 2.
- [10] Jadaun GP, Das R, Upadhyay P, et al. Role of embCAB gene mutations in ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates from India[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(5): 483-486.