

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.06.006

· 论 著 ·

某院结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药基因特征

刘厚明¹, 陈 珊¹, 黄莎莎², 单万水¹

(1 深圳市第三人民医院, 广东 深圳 518112; 2 广东医科大学, 广东 湛江 524002)

[摘要] **目的** 了解某院结核分枝杆菌(MTB)利福平耐药相关基因 *rpoB* 及异烟肼耐药相关基因 *katG*、*inhA* 的突变特征, 为耐药结核病的预防和治疗提供科学依据。**方法** 收集 83 例结核病患者痰标本, 分离培养 MTB, 采用 BD960 液体法检测利福平、异烟肼耐药性, 提取菌株 DNA, 采用聚合酶链反应扩增 *rpoB*、*katG*、*inhA* 全基因, 对扩增产物进行测序分析。**结果** 83 株样本中, 39 株对利福平耐药, 51 株对异烟肼耐药。耐利福平菌株 *rpoB* 基因突变率为 97.44% (38/39), 531 位点突变率 60.53% (23/38), 526 位点突变率 23.68% (9/38), 32 株出现多位点联合突变。耐异烟肼菌株 *katG* 基因突变率为 98.04% (50/51), 共发现 16 种突变类型, 其中以 *katG* 315 位点突变为, 占 70.00% (35/50), 1 株为 *katG* 与 *inhA* 联合突变。**结论** 该院耐多药 MTB 产生耐药性与 *rpoB* 和 *katG* 基因突变相关, 检测 MTB 耐多药相关基因突变可为早期快速诊断耐药结核病提供参考依据。

[关键词] 结核分枝杆菌; 利福平; 异烟肼; 耐多药; 基因突变

[中图分类号] R378.91⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)06-0490-06

Characteristics of rifampicin and isoniazid resistance genes in *Mycobacterium tuberculosis* in a hospital

LIU Hou-ming¹, CHEN Shan¹, HUANG Sha-sha², SHAN Wan-shui¹ (1 The Third People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518112, China; 2 Guangdong Medical University, Zhanjiang 524002, China)

[Abstract] **Objective** To understand the mutation characteristics of rifampicin resistance gene *rpoB* as well as isoniazid resistance genes *katG* and *inhA* of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in a hospital, and provide scientific basis for the prevention and treatment of drug-resistant tuberculosis. **Methods** MTB strains were isolated from sputum specimens of 83 patients with tuberculosis, rifampicin and isoniazid resistance was detected by BD960 liquid culture method, DNA of MTB was extracted, complete genome of *rpoB*, *katG* and *inhA* were amplified by polymerase chain reaction, the amplified product was sequenced and analyzed. **Results** Among 83 strains from specimens, 39 strains were resistant to rifampicin and 51 were resistant to isoniazid. The mutation rate of *rpoB* gene of rifampicin-resistant strain was 97.44% (38/39), mutation rate of locus 531 and locus 526 were 60.53% (23/38) and 23.68% (9/38) respectively, combined mutation of multilocus appeared in 32 strains. The mutation rate of *katG* gene in isoniazid-resistant strains was 98.04% (50/51), a total of 16 types of mutations were found, the majority of which were point mutations at *katG* 315, accounting for 70.00% (35/50), and one isolate was combined mutation of *katG* and *inhA*. **Conclusion** Resistance of multidrug-resistant (MDR) MTB is related to mutation in *rpoB* and *katG* genes, detection of MDR gene mutation in MTB can provide reference for early and rapid diagnosis of tuberculosis.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; rifampicin; isoniazid; multidrug resistance; gene mutation

[Chin J Infect Control, 2018, 17(6): 490-495]

[收稿日期] 2017-09-01

[基金项目] 深圳市科技计划项目(JCYJ20170307095303424); 深圳市生物芯片研究重点实验室基金项目(ZDSYS201504301534057); 深圳市“三名工程”专项资金(SZSM201412005)

[作者简介] 刘厚明(1974-), 男(汉族), 湖北省武汉市人, 主任技师, 主要从事临床检验研究。

[通信作者] 单万水 E-mail: 13923478156@qq.com

结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染引起的一种对人类健康危害严重的慢性传染病。2015 年全球新增结核病例 1 040 万,新增耐多药结核病例 48 万,超半数来自印度、中国和俄罗斯^[1]。结核病是 2016 年传染性疾病中排名第一的死亡原因^[2]。我国现有 427 万活动性肺结核患者,是全球 30 个结核病高负担国家之一,新发结核病例位居全球第三,新增耐多药结核患者数居全球第二^[3]。耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)是指结核病患者感染的 MTB 至少同时对利福平(rifampicin, RFP)和异烟肼(isoniazid, INH)产生耐药性^[4]。2015 年我国每 10 位结核病患者中仅有 3 位得到准确诊断,每 100 位 MDR-TB 患者仅有 5 位获得有效治疗^[5]。目前,快速检测 MTB 耐药相关基因的方法在全球范围内日益增多,国内各地区积极开展研究地区耐药基因突变特征,以期获得快速分子检测信息。本研究通过基因测序法分析结核分枝杆菌 RFP 耐药相关基因 *rpoB* 和 INH 耐药相关基因 *katG*、*inhA* 启动子的突变情况,探讨某院耐药结核分枝杆菌临床分离株 *ropB*、*katG* 和 *inhA* 基因突变特征及其与耐药性的相互关系,为新兴 MDR-TB 分子诊断技术在本地地区的应用提供理论支撑,也为该院制定耐药结核病防治规划提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2012 年 8 月—2014 年 5 月某市传染病专科医院住院患者送检痰标本分离培养的 MTB 83 株,菌株来源包括新发和复发患者,年龄为 15~77 岁;男性 56 例,女性 27 例。所有 MTB DNA 标本均保存于-70℃冰箱并统一进行相关耐药基因突变位点检测。

1.2 研究方法

1.2.1 菌株分离鉴定及药敏试验 严格按照国家结核病细菌学检验标准化规程进行试验,标本用 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养仪培养,培养阳性的菌株进行抗酸染色,利用实时荧光定量 PCR 进行菌种鉴定。采用世界卫生组织(WHO)推荐的比例法对 RFP、INH、链霉素和乙胺丁醇进行敏感性试验,4 种药物在培养基中的临界浓度分别为 1、0.1、1 和 5 mg/L,根据待测管与空白对照管中分枝杆菌的生长情况对比判断该药的敏感性,结果判读为耐药(R)或敏感(S)。

1.2.2 细菌 DNA 的制备 吸取一定量的液体培养基中生长的 MTB,在 80℃恒温箱中灭活 60 min,使用 Qiagen 公司的细菌基因提取试剂盒提取基因组 DNA,操作按说明书进行。

1.2.3 引物设计与合成 通过 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 的 genbank 获得标准株 H37Rv *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 基因全序列,采用 primer premier 5.0 设计引物,引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 目的基因扩增引物序列

Table 1 Primer sequences of amplification for target genes

引物	序列(5' - 3')	产物长度(bp)
<i>rpoB</i> -F	GCCAGAGCAAAACAGCC	749
<i>rpoB</i> -R	GTTGCGGGACAGATTGAT	
<i>katG</i> -F	AGCAACACCCACCCATTAC	581
<i>katG</i> -R	ACAGGACGCGACGAAGT	
<i>inhA</i> -F	TTACAGGACTGCTGGACG	257
<i>inhA</i> -R	TCCGTCGGCGTAGATG	

1.2.4 目的基因的扩增与测序 PCR 反应体积为 50 μ L,包括 3 μ L 模板,5 μ L 10 \times LA PCR Buffer II,2.5 μ L 引物,8 μ L dNTP 混合液,0.5 μ L Taq PCR master mix,31 μ L 去离子水。扩增条件:94℃变性 1 min;94℃30 s,58℃30 s,72℃210 s,30 个循环;72℃延伸 7 min。PCR 产物送华大基因公司进行纯化和测序,测序结果与 MTB 标准株 H37Rv 序列比对分析。

1.3 统计分析 应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏结果 收集的 83 株 MTB 临床样本中,耐药株 60 株,全敏感株 23 株。其中 RFP 耐药株 39 株,敏感株 44 株;INH 耐药株 51 株,敏感株 32 株;对 RFP 及 INH 同时耐药 30 株。

2.2 RFP 耐药相关基因 *rpoB* 的突变特征 39 株 RFP 耐药株中有 38 株检测到 *rpoB* 基因突变,突变率达 97.44%(38/39),其中 36 株在 *rpoB* 基因 81bp 的基因核心区域内发生突变,2 株在 1 156 位点发生突变。测序结果显示,39 株 RFP 耐药株中共发现 19 种突变形式,其中 9 种为本研究新发现的突变类型,主要包括两个以上密码子联合突变、点突变、同一

密码子双重突变,未发现碱基插入或缺失。突变菌株中单位点突变有 6 株(15.79%),多位点联合突变有 32 株(84.21%)。最常见的突变位点为 531 位点,突变率达 60.53%(23/38),变化形式主要由组氨酸

(His)突变为亮氨酸(Leu)或酪氨酸(Tyr);其次的突变位点为 526 位点,突变率为 23.68%(9/38)。44 株 RFP 敏感菌株中有 31 株检测到突变,其中 1 156 位点同义突变占 80.65%(25/31)。见表 2。

表 2 83 株 MTB RFP 耐药相关基因 *rpoB* 突变特征

Table 2 Mutation characteristics of RFP resistance gene *rpoB* in 83 strains of MTB

核苷酸突变类型	氨基酸改变	突变菌株数 (突变率,%)	DST 表型耐药结果	
			耐药株数	敏感株数
NM	NM ^a	14(16.87)	1	13
GAA→GGA + TCG→TTG + GCT→GCC	E162G ^b + S531L + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
ACG→CCG + TCG→TTG	T240P ^b + S531L	2(2.41)	2	0
GGC→GAC + TCG→TTG	G317C ^b + S531L	1(1.20)	1	0
TCG→CCG + TTC→GTC + GAC→GTC + GCT→GCC	S335P ^b + F505V ^b + C516V + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
GCG→GTG + TCG→TTG + GCT→GCC	A357V ^b + S531L + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
GAC→GAT + GCT→GCC	D382D ^c + A1156A ^c	1(1.20)	0	1
CGG→TGG + TCG→TTG + GCT→GCC	R478W ^b + S531L + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
ATC→TTC	I572F	1(1.20)	0	1
CTG→CCG	L511P	1(1.20)	0	1
CTG→CGG + GAC→TAC + GCT→GCC	L511R + D516Y + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
CTG→CCG + CAC→AAC + AGG→AAG	L533P + H526N	1(1.20)	1	0
CTG→CCG + TCG→TTG	L511P + S574L	1(1.20)	1	0
CTG→CCG + TCG→TTG + GCT→GCC	L511P + S574L + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
CTG→CCG + GCT→GCC	L511P + A1156A ^c	1(1.20)	0	1
GAC→TAC + CAC→GAC + GCT→GCC	D516Y + H526D + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
CAC→TGC	H526C	1(1.20)	0	1
CAC→TAC	H526Y	2(2.41)	2	0
CAC→GAT + AAC→ACC + GCT→GCC	H526D + N597T ^b + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
CAC→TAC + CAT→AAT + GCT→GCC	H526Y + H830N ^b + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
CAC→CGC + CGC→CTC + GCT→GCC	H526R + R952L ^b + A1156A ^c	1(1.20)	1	0
CAC→AAC + GCT→GCC	H526N + A1156A ^c	1(1.20)	0	1
CAC→CGC + GCT→GCC	H526R + A1156A ^c	2(2.41)	2	0
TCG→TTG	S531L	2(2.41)	2	0
TCG→TTG + GCT→GCC	S531L + A1156A ^c	15(18.07)	15	0
GCT→GCC	A1156A ^c	27(32.53)	2	25

注:NM^a 为无基因突变;b 为 TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库(<http://www.tbdreamdb.com>)中未报道位点;c 为氨基酸同义突变,该位点在 TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库中未见报道;突变前后改变氨基酸使用一字码简写;TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库查询日期为 2017 年 7 月 25 日

2.3 INH 耐药相关基因 *katG*、*inhA* 的突变特征
98.04%(50/51)的 INH 耐药株在 *katG* 基因出现突变,其中 14 株为单位点突变,36 株存在多位点联合突变。14 株单位点突变菌株中,有 8 株为 *katG* 315 位点突变;36 株多位点联合突变菌株中,有 27 株为 *katG* 315 位点突变;*katG* 315 位点突变率为 70.00%(35/50)。32 株 INH 敏感菌株中未发现 *katG* 315 位点突变。*katG* 463 位点密码子在耐药株

和敏感株中均检测到突变,突变率分别为 74.51%(38/51)、59.38%(19/32),两者突变率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 2.09, P = 0.15$)。51 株 INH 耐药株中仅 1 株检测到 *inhA* 21 位点突变,且为 *inhA* 21 位点与 *katG* 463 位点联合突变,其余 50 株分离株 *inhA* 21 位点基因序列与标准株 H37Rv 序列均一致;INH 敏感株未检测到 *inhA* 21 位点基因突变。见表 3。

表 3 83 株 MTB 分离株 *katG*、*inhA* 基因突变情况
Table 3 Mutation of *katG* and *inhA* genes in 83 MTB strains

核苷酸突变类型	氨基酸改变	突变菌株数 (突变率, %)	DST 表型耐药结果	
			耐药株数	敏感株数
NM	NM ^a	11(13.25)	1	10
CCG→ACG + GTC→ATC + CGG→CTG	P100T ^b + V196I ^b + R463L	1(1.20)	1	0
GCG→GTG + CGG→CTG	A106V + R463L	1(1.20)	1	0
TGG→GGG	W191G ^b	1(1.20)	1	0
TGG→CGG	W191R	1(1.20)	0	1
TGG→GGG + CGG→CTG	W191G ^b + R463L	2(2.41)	1	1
GCC→GCA + AGC→ACC + CGG→CTG	A203A ^c + S315T + R463L	1(1.20)	1	0
GCG→GTG	A264V ^b	1(1.20)	1	0
AGC→AAC	S315N	1(1.20)	1	0
AGC→ACA	S315T	2(2.41)	2	0
AGC→ACC	S315T	5(6.02)	5	0
AGC→GGC + CGG→CTG	S315G + R463L	1(1.20)	1	0
AGC→ACC + CGG→CTG	S315T + R463L	25(30.12)	25	0
CCG→TCG + CGG→CTG	P325S ^b + R463L	1(1.20)	1	0
ACG→TCG	T344S	1(1.20)	0	1
ACG→ACA + TAC→GAC	T345T ^c + Y608D ^b	2(2.41)	2	0
CGG→CTG	R463L	21(25.30)	3	18
CGG→CTG + GGC→GAC	R463L + G490D ^b	1(1.20)	1	0
CGG→CTG + AAC→GAC	R463L + N508D ^b	2(2.41)	2	0
ACC→GCC	T568A	1(1.20)	0	1
CGG→CTG + ATC→GTC	R463L + I21V [*]	1(1.20)	1	0

*: 为 *inhA* 基因上的密码子; NM^a 为无基因突变; b 为 TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库(<http://www.tbdreamdb.com>)中未报道位点; c 为氨基酸同义突变, 该位点在 TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库中未见报道; 突变前后改变氨基酸使用一字母缩写; TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库查询日期为 2017 年 7 月 25 日

3 讨论

21 世纪以来, 随着耐药 MTB 的出现和传播, 全球结核病疫情呈现死灰复燃的态势, 耐药结核病患者尤其是耐多药及广泛耐药性结核病患者逐年增加, 给公共卫生安全带来严重威胁。INH 和 RFP 作为目前使用最广泛的一线抗结核药物, 在 MTB 耐药谱中高居前 2 位^[6], 而 INH 和 RFP 较高耐药率的出现, 主要与其耐药基因突变相关^[7]。全国各地关于 MTB 耐 RFP 和 INH 相关基因的突变频率存在差异, 因此, 以地区为单位研究 MTB 耐药基因的突变特征对各地区开展结核病防治工作有重大意义。

rpoB 是 MTB RNA 聚合酶 β 亚单位的编码基因, 长约 3 534 bp, 编码 1 178 个氨基酸。大量研究^[8-9]表明, 90%~97% 耐 RFP 的 MTB 是由 *rpoB* 基因内的 RFP 耐药基因核心区 (rifampicin resistance determining region, RRDR) 发生突变引起。本研究结果显示, 83 株 MTB 中有 39 株出现 RFP 耐药, RFP 耐药率为 46.99%, 耐 RFP 菌株中检测到

rpoB 基因 RRDR 区域内突变 36 株, 突变率达 92.31%(36/39)。本研究中不计入同义突变类型, 最常见的突变位点是 531、526 位点, 突变频率分别为 60.53%(23/38) 和 23.68%(9/38), 两位点突变频率之和占 84.21%(32/38); 其中 531 位点突变频率高于湖南报道的 51.1%^[10] 和江苏报道的 55.4%^[11], 低于新疆地区报道的 73.6%^[12], 说明地区间 *rpoB* 531 突变频率存在一定差异。此外, 发现有 3 株菌在 RRDR 区内出现双碱基突变, 以 *rpoB* 511 和 516 位点、*rpoB* 516 和 526 位点以及 *rpoB* 526 和 533 位点联合突变的形式存在, 考虑可能 *rpoB* 511、516 和 533 位点突变与 RFP 低浓度耐药有关^[13]。RRDR 区域外发现 2 个同义突变位点 D382D 和 A1156A, 可能与 RFP 耐药无关^[14]。本研究还检测到 10 个未被 TBDRaMDB 结核分枝杆菌数据库收录的 E162G、T240P、G317D 等位点, 这些位点以与 RRDR 区的 *rpoB* 531、526、516、511 等位点联合突变的形式存在, 分析这种联合突变类型中 RRDR 区的突变位点可能对 MTB 耐 RFP 起主导作用, 区域外与之联合突变的位点与 RFP 耐药的相关性并不明确, 也许有协同作用, 也可能与 RFP

耐药无关,尚待日后研究。本研究中发现 MTB 耐 RFP 以 *rpoB* 531 位点突变为,其次是 526 位点,与 2012 年广东地区报道^[15] *rpoB* 基因突变特征相似,说明检测此两位点存在突变与否可以作为该地区 MTB 对 RFP 耐药性的分子诊断依据。

INH 是前体药物,通过被动扩增进入 MTB 菌体内,能抑制细胞壁分枝菌酸的合成,从而破坏其完整性以达到杀菌目的。INH 耐药机制复杂,涉及 *katG* 酶、烯酰脂酰载体蛋白还原酶(*inhA*)、 β -酮酰基运载蛋白合成酶(*kasA*)、烷基过氧化氢还原酶(*ahpC*)和还原型辅酶 I 脱氢酶(*ndh*)等基因。据研究报道,85% 以上 INH 耐药株存在 *katG* 基因和 *inhA*-15 位点突变^[16-18]。本研究中,83 株 MTB 菌株有 51 株耐 INH,耐药率为 61.45%,检测到 *katG* 基因序列突变为 50 株,突变率为 98.04%(50/51),仅 1 株检测到 *inhA* 突变,表明 *katG* 基因突变与 INH 耐药相关。本次测序结果显示,*katG* 315 位点突变率为 70.00%(35/50),且存在 *katG* 315 突变的均为 INH 耐药株,说明在该院可将 *katG* 315 突变作为快速检测 MTB 对 INH 耐药性的一个可靠标志。同时,INH 耐药株中还检测到 *katG* 基因 P100T、V196I、W191G 等 8 个未被 TBDRaMDB 结核菌数据库收录的突变位点,除多态性位点、同义突变和联合突变,W191G、A264V、P325S、Y608D、G490D、N508D 位点均属单碱基有效突变,以上位点可能与 INH 耐药相关,但需更多数据和相关研究证实。

inhA 基因最常见的突变位点是 *inhA*-15 和 *inhA*-8 位点,*inhA* 启动子突变被证实与 INH 低浓度耐药相关^[19]。本实验中仅 1 株出现 *inhA* 基因突变,占突变株的 2.00%(1/50),低于 Zhou 等^[20] 的研究结果,与 Tseng 等^[21] 的研究结果相似,由此推测耐药株中 *inhA* 基因突变具有地域差异性,在该院 *inhA* 基因的突变频率偏低,但也不排除是因样本量较少所致。除此之外,本实验在 INH 耐药株和敏感株中均检测到 *katG* 463(CGG-CTG)突变,据报道 *katG*463 突变是自然存在的基因多态性位点,与 INH 耐药性无关^[22]。

本实验采用 BD MGIT 960 RISE 比例法和 DNA 测序法对本院耐 RFP 和 INH 的 MTB 相关基因的突变情况进行分析,发现 30 株耐多药菌株均发生 *rpoB* 和 *katG* 基因联合突变,说明 *rpoB* 和 *katG* 基因存在协同作用,同时发生突变可导致 MTB 对 RFP 和 INH 产生耐药,且有报道^[23] 指出

90%~95% 耐 RFP 的 MTB 菌株同时耐 INH,单独对 MTB 进行 RFP 耐药性分析可初步鉴定 MDR-TB。另外,61 株耐药株中仍有 2 株未检测到相关基因突变,提示这些菌株的突变点可能出现在本实验扩增的相关基因区域外,或是由其他耐药机制引起,比如异源性耐药等。一些 MTB 耐药基因突变位点与表型耐药之间的关系并不十分明确,仍需继续研究以提高基因检测的特异性和灵敏度。

总之,MTB 耐药基因突变情况存在地域差异,可能受样本量大小和抽样方式、人群遗传背景、菌株进化背景以及环境等因素影响。医院可通过筛检 *rpoB* 基因的 RRDR 区域、*katG* 基因高频突变点作为初步快速判断耐多药 MTB 耐药性的方法之一。

[参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017 [R]. Geneva, WHO, 2017.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [R]. Geneva, WHO, 2016.
- [3] 中华人民共和国国务院办公厅.“十三五”全国结核病防治规划[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2017, 24(5):1-5.
- [4] Zhao LL, Chen Y, Liu HC, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China[J]. Antimicrobial Agents Chemother, 2015, 58(4): 1997-2005.
- [5] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015 [R]. Geneva, WHO, 2015.
- [6] Yakrus MA, Driscoll J, Lentz AJ. Concordance between molecular and phenotypic testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates for resistance to rifampin and isoniazid in the United States[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(6): 1932-1937.
- [7] Kalokhe AS, Shafiq M, Lee JC, et al. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing [J]. Am J Med Sci, 2013, 345(2): 143-148.
- [8] Ullah I, Shah AA, Basit A, et al. Rifampicin resistance mutations in the 81bp RRDR of *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using Xpert MTB/RIF in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan: a retrospective study[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1): 413.
- [9] Chen Y, Zhao B, Liu HC, et al. Prevalence of mutations conferring resistance among multi- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in China[J]. J Antibiot (Tokyo), 2016, 69(3): 149-152.
- [10] 周志红, 王华洪. *rpoB* 基因突变与结核分枝杆菌利福平耐药相关性研究[J]. 实用预防医学, 2013, 20(10):1189-1191.
- [11] 张海晴, 黄海滨, 刘成永, 等. 徐州地区结核分枝杆菌基因分型及其与利福平耐药基因突变的关系[J]. 2017, 38(2):223

- 224, 228.
- [12] 杨建东, 陈阳贵, 马丽, 等. 乌鲁木齐市耐多药结核分枝杆菌基因突变特征分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(1): 22 - 25.
- [13] Tekwu EM, Sidze LK, Assam JP, et al. Sequence analysis for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from the Central Region of Cameroon[J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 113.
- [14] 廖小琴, 刘梅, 彭章丽, 等. 耐利福平结核分枝杆菌 *rpoA*、*rpoB*、*rpoC* 和 *rpoZ* 突变的研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(22): 38 - 40.
- [15] 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.
- [16] Jagielski T, Grzeszczuk M, Kamiński M, et al. Identification and analysis of mutations in the *katG* gene in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. Pneumonol Alergol Pol, 2013, 81(4): 298 - 307.
- [17] Chen XY, Kong F, Wang Q, et al. Rapid detection of isoniazid, rifampin and ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using high resolution melting analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3450 - 3457.
- [18] Wang F, Shen H, Guan M, et al. High-resolution melting facilitates mutation screening of *rpsL* gene associated with streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Microbiol Res, 2011, 166(2): 121 - 128.
- [19] Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, et al. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low level resistance to isoniazid in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(7): 2263 - 2268.
- [20] Zhou A, Nawaz M, Duan Y, et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Xi'an, China[J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(2): 275 - 281.
- [21] Tseng ST, Tai CH, Li CR, et al. The mutations of *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2015, 48(3): 249 - 255.
- [22] Herrera L, Valverde A, Saiz P, et al. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated in the Philippines [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 23(6): 572 - 576.
- [23] Chia BS, Lanzas F, Rifat D, et al. Use of multiplex allele-specific polymerase chain reaction (MAS-PCR) to detect multi-drug-resistant tuberculosis in Panama[J]. PloS One, 2012, 7(7): e40456.

(本文编辑:刘思娣、左双燕)