

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20233443

· 论 著 ·

## 广西地区结核分枝杆菌异烟肼耐药基因突变特征分析

秦翊翔<sup>1</sup>, 蓝如束<sup>2</sup>, 覃慧芳<sup>3</sup>, 叶 婧<sup>3</sup>, 秦小玲<sup>1</sup>, 甘 丽<sup>1</sup>, 刘 港<sup>1</sup>, 徐若兰<sup>1</sup>, 罗 丹<sup>1</sup>

(1. 广西中医药大学公共卫生与管理学院, 广西 南宁 530200; 2. 广西江滨医院检验科, 广西 南宁 530021; 3. 广西壮族自治区疾病预防控制中心结核病防制所, 广西 南宁 530021)

**[摘要]** **目的** 分析广西地区结核分枝杆菌异烟肼(INH)耐药基因的突变特征,为耐药结核病的分子诊断提供依据。**方法** 选取 2018 年广西 30 个结核病耐药监测点收集的结核分枝杆菌菌株库中 122 株耐 INH 菌株和 530 株全敏感菌株进行全基因组测序。**结果** 652 株结核分枝杆菌复合群菌株中,127 株(19.48%)发生 INH 耐药基因突变,分别为 *katG*(15.64%,102 株)、*fabG1*(1.69%,11 株)、*ahpC*(1.07%,7 株)、*kasA*(0.61%,4 株)和 *inhA*(0.46%,3 株)基因突变。INH 耐药表型与基因突变的符合率为 90.03%,比例法药敏检测 INH 耐药与基因测序检测基因突变结果吻合度不高( $Kappa = 0.677$ )。突变类型共有 19 种,单位点突变占 96.85%,联合位点突变占 3.15%。突变比率最高的位点为 *katG315*(71.65%),碱基变化以 AGC-ACC 形式占比最高(12.13%)。*katG*、*ahpC* 和 *kasA* 基因突变比例在 INH 耐药株中高于敏感株(均  $P < 0.05$ ),INH 耐药株和敏感株 *inhA*、*fabG1* 基因突变比例比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。北京株、非北京株中 *katG315* 突变率最高,分别为 18.75%(81/432)、4.55%(10/220),两种基因型菌株 *katG* 基因突变位点分布比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 16.253, P = 0.039$ )。**结论** 广西地区 INH 耐药基因突变以 *katG315* 位点突变为,INH 耐药表型与基因突变吻合度不高。*katG*、*ahpC* 与 *kasA* 基因突变与 INH 表型耐药有相关性。北京基因型与 *katG* 基因的突变有相关性。

**[关键词]** 结核; 肺结核病; 结核分枝杆菌; 异烟肼; 基因位点; 基因突变**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2

## Mutation characterization of isoniazid resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* in Guangxi region

QIN Yi-xiang<sup>1</sup>, LAN Ru-shu<sup>2</sup>, QIN Hui-fang<sup>3</sup>, YE Jing<sup>3</sup>, QIN Xiao-ling<sup>1</sup>, GAN Li<sup>1</sup>, LIU Gang<sup>1</sup>, XU Ruo-lan<sup>1</sup>, LUO Dan<sup>1</sup> (1. Academy of Public Health and Management, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Guangxi Jiangbin Hospital, Nanning 530021, China; 3. Institute for Tuberculosis Control, Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530021, China)**[Abstract]** **Objective** To analyze the mutation characteristics of isoniazid (INH) resistance gene of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in Guangxi region, and provide basis for molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis.**Methods** 122 INH-resistant strains and 530 susceptible strains were obtained from the MTB strain library collected from 30 tuberculosis drug resistance monitoring points in Guangxi region, and underwent whole genome sequencing.**Results** Among 652 strains of MTB complex group, 127 (19.48%) had INH resistance gene mutations, including *katG* (15.64%,  $n = 102$ ), *fabG1* (1.69%,  $n = 11$ ), *ahpC* (1.07%,  $n = 7$ ), *kasA* (0.61%,  $n = 4$ ) and *inhA* (0.46%,  $n = 3$ ) gene mutations. The coincidence rate of INH resistance phenotype and gene mutation was

[收稿日期] 2022-10-08

[基金项目] 广西自然科学基金面上项目(2017GXNSFAA198330);广西中医药大学博士科研启动项目(2017BS004);广西中医药大学研究生创新项目(YCSW2021226);广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2017066)

[作者简介] 秦翊翔(1995-),男(汉族),广西桂林市人,硕士研究生,主要从事结核病分子流行病学研究。

[通信作者] 罗丹 E-mail: Luodan.2005@163.com

90.03%, and the coincidence rate of INH resistance detected by proportional method and gene mutation detected by gene sequencing was not high ( $Kappa = 0.677$ ). There are 19 types of mutations, with single locus mutation accounting for 96.85% and combined mutation accounting for 3.15%. The locus with the highest mutation rate was *katG315* (71.65%). The proportion of base change in the form of AGC-ACC was the highest (12.13%). The proportion of mutations in *katG*, *ahpC* and *kasA* genes in INH-resistant strains was higher than that in susceptible strains (all  $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the proportion of mutations in *inhA* and *fabG1* genes between INH-resistant strains and susceptible strains (all  $P > 0.05$ ). Beijing strains and non-Beijing strains had the highest mutation rates of *katG315*, which were 18.75% (81/432) and 4.55% (10/220) respectively. Difference in distribution of mutation loci of *katG* gene in two genotypes of strains was statistically significant ( $\chi^2 = 16.253$ ,  $P = 0.039$ ). **Conclusion** The mutation of INH resistance gene in Guangxi region is mainly at *katG315* locus, and the INH resistance phenotype and gene mutation are not consistent. Mutations in *katG*, *ahpC* and *kasA* genes are associated with INH phenotypic resistance. Beijing genotype is associated with the mutation of *katG* gene.

**[Key words]** tuberculosis; pulmonary tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; isoniazid; gene locus; gene mutation

结核病是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)感染引起的慢性传染病,也是由单一致病菌感染引起死亡人数最多的疾病,仅次于人类免疫缺陷病毒(HIV)<sup>[1-2]</sup>,结核病主要病变累及部位为肺部<sup>[3]</sup>。短程化学治疗(简称化疗)与抗结核药物的联合治疗是世界卫生组织(WHO)为控制结核病制定的一项重要战略<sup>[4]</sup>。而异烟肼(isoniazid, INH)是结核病化疗方案中最主要的杀菌药物之一,自20世纪60年代起便开始应用于临床,对结核病有较好的疗效。但近年来,INH耐药问题日益凸显,已成为结核病控制面临的严峻挑战之一。结核菌株对INH耐药,严重影响其疗效,更易导致耐多药(MDR)结核病。因此研究MTB对INH的耐药机制,对结核病,尤其是耐INH和MDR患者的诊断及治疗有着重要意义。基因突变是MTB耐药的主要机制,本研究采用全基因组测序技术,明确某地区MTB INH耐药基因突变特征,探讨其与INH耐药表型的关系,为该地区MDR结核病的诊断及治疗提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 研究纳入的菌株来源于广西30个结核病耐药监测点2018年收集的所有痰涂片阳性肺结核患者的痰标本。所有痰标本经过改良罗氏培养基培养,培养阳性的菌株进一步用含对硝基苯甲酸和噻吩-2-羧酸肼培养基进行初步菌种鉴定为MTB复合群菌株后,经过比例法药敏检测,获得652株菌株(122株为INH耐药菌株,530株为INH敏感菌株)放入冻存管冷冻保存,以备后续研究使用。

### 1.2 研究方法

**1.2.1 比例法药敏** 将罗氏培养基中MTB复合群菌株可见菌落进行药敏试验,试验流程严格遵守《结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化操作程序及质量保证手册》操作,INH药物试验浓度采用0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**1.2.2 菌株培养** 将含有菌液的冻存管放置37℃恒温培养箱中复苏。吸取0.10~0.15 mL菌液均匀接种于培养管的罗氏培养基上,每株菌接种2支培养管,将培养管放置37℃恒温培养箱中孵育。具体操作参考《结核病实验室检验规程》<sup>[5]</sup>。培养基购自珠海贝索生物技术有限公司。

**1.2.3 DNA提取** 采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取DNA<sup>[6]</sup>,在1.5 mL离心管加入400  $\mu\text{L}$  1×TE缓冲液并取满环生长良好的MTB,置于80℃水浴30 min灭活,将灭活菌液在细菌超声分散计数仪超声1 min,使细菌充分分散,加入溶菌酶使细菌充分破壁,然后用SDS/蛋白酶K混合,用CTAB/NaCl溶液沉淀非核酸细胞碎片,用氯仿/异戊醇提取DNA,在提取液中加入异丙醇使DNA沉淀,沉淀物经洗涤且自然干燥后,加入50  $\mu\text{L}$  1×TE缓冲液使沉淀物充分溶解,置-20℃保存备用,作为全基因组测序的DNA模板。

**1.2.4 全基因组测序** 由北京诺禾致源生物科技有限公司完成检测,利用高通量二代Illumina测序技术平台,进行DNA片段文库构建,双端测序,PE150,深度至少200×,每个样品总测序深度数据量 $\geq 1$  G clean data。测序数据经过过滤处理,去除包含Adapter的序列及低质量数据,得到的Clean Data用于后续分析。

**1.3 统计分析** 应用SPSS 20.0统计软件进行数据

的整理与分析,定性资料采用率或构成比进行统计描述,组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法。比较比例法药敏检测 INH 耐药与基因测序检测 INH 基因突变之间进行一致性 *Kappa* 检验,*Kappa* 值  $\geq 0.75$  认为两者吻合度较强。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 基因测序结果** 对 652 株 MTB 复合群菌株进行全基因组测序,结果显示,基因测序检测 INH 耐药的灵敏度为 75.41%,特异度为 93.40%,正确指数为 0.69,阳性似然比为 11.43,阴性似然比为 0.26,符合率为 90.03%。比较基因测序耐药基因突变与比例法药敏检测 INH 耐药结果,差异无统计学意义(*McNemar* 检验  $P = 0.620$ ),*Kappa* 值 = 0.677。见表 1。

**2.2 MTB INH 耐药基因突变分布情况** 测序结果显示,652 株 MTB 临床分离株中,127 株(19.48%)发生了基因突变。突变的基因分别为 *katG*(15.64%,

**表 1** 基因测序耐药基因突变与比例法药敏检测 INH 耐药结果比较

**Table 1** Comparison of INH resistance results between gene sequencing for drug-resistant gene mutation and proportional method drug susceptibility

基因测序	比例法药敏		合计
	INH 耐药	INH 敏感	
INH 耐药基因突变	92	35	127
未发生 INH 耐药基因突变	30	495	525
合计	122	530	652

102 株)、*fabG1*(1.69%,11 株)、*ahpC*(1.07%,7 株)、*kasA*(0.61%,4 株)和 *inhA*(0.46%,3 株)。突变形式有 19 种,以单位点突变为主,占 96.85%(123/127),联合位点突变占 3.15%(4/127)。在所有突变的位点中,*katG315* 单位点突变所占比例最高,为 71.65%(91/127),其次为 *fabG1-15* 位点(7.87%,10/127),*katG315* 和 *fabG1-15* 单位点突变占总突变的 80.31%。见表 2。

**表 2** INH 耐药基因突变位点分布情况( $n = 652$ )

**Table 2** Distribution of mutation loci in INH resistance genes ( $n = 652$ )

序号	突变位点	碱基的改变	氨基酸的改变	突变菌株数	合计	突变比例(%)
1	<i>katG127</i>	CAG-CCG	谷氨酰胺 - 脯氨酸	1	1	0.15
2	<i>katG138</i>	AAC-GAC	天冬酰胺 - 天冬氨酸	1	2	0.31
	<i>katG138</i>	AAC-CAC	天冬酰胺 - 组氨酸	1		
3	<i>katG142</i>	GAC-GCC	天冬氨酸 - 丙氨酸	1	1	0.15
4	<i>katG315</i>	AGC-AAC	丝氨酸 - 天冬氨酸	9	91	13.96
	<i>katG315</i>	AGC-ACC	丝氨酸 - 苏氨酸	79		
	<i>katG315</i>	AGC-GGC	丝氨酸 - 甘氨酸	1		
	<i>katG315</i>	AGC-AGT	丝氨酸 - 丝氨酸	2		
5	<i>katG335</i>	ATC-ACC	异亮氨酸 - 苏氨酸	2	2	0.31
6	<i>katG461</i>	CAG-CCG	谷氨酰胺 - 脯氨酸	1	1	0.15
7	<i>katG735</i>	GAC-GCC	天冬氨酸 - 丙氨酸	1	1	0.15
8	<i>kasA312</i>	GGC-AGC	甘氨酸 - 丝氨酸	3	3	0.46
9	<i>kasA121</i>	AGG-AAG	精氨酸 - 赖氨酸	1	1	0.15
10	<i>fabG1-8</i>	C-T	-	1	1	0.15
11	<i>fabG1-15</i>	C-T	-	10	10	1.53
12	<i>ahpC-48</i>	G-A	-	1	1	0.15
13	<i>ahpC-52</i>	C-T	-	3	3	0.46
14	<i>ahpC-54</i>	C-T	-	1	1	0.15
15	<i>ahpC-81</i>	C-T	-	1	1	0.15
16	<i>ahpC-81 + ahpC-54</i>	C-T + C-T	-	1	1	0.15

续表 2 (Table 2, Continued)

序号	突变位点	碱基的改变	氨基酸的改变	突变菌株数	合计	突变比例(%)
17	katG315 + katG317	AGC-ACC + ATC-GTC	丝氨酸 - 苏氨酸异亮氨酸 - 缬氨酸	1	1	0.15
18	katG315 + katG315	AGC-CGC + AGC-ATC	丝氨酸 - 精氨酸丝氨酸 - 异亮氨酸	1	2	0.31
	katG315 + katG315	AGC-ACC + AGC-AGA	丝氨酸 - 苏氨酸丝氨酸 - 精氨酸	1		
19	inhA-15	C-T	-	3	3	0.46
合计	-	-	-	127	127	19.48

2.3 *katG* 突变特征 在 122 株 INH 耐药株中 84 株(占 68.85%)发生 *katG* 基因突变,530 株 INH 敏感株中 18 株(占 3.40%)发生 *katG* 基因突变,INH 耐药株中 *katG* 基因突变比例高于敏感株( $\chi^2 = 21.886, P = 0.005$ )。突变比例最高的位点为 *katG315*, *katG315* 单位点突变比率在 INH 耐药株(63.93%, 78/122)中高于敏感株(2.45%, 13/530) ( $\chi^2 = 312.154, P < 0.001$ )。 *katG315* 位点碱基变化以 AGC-ACC 形式比例最高(12.13%, 79/652), 在 INH 耐药株中比率为 56.56%, 在全敏感株中比率为 1.89%。见表 3。

表 3 INH 耐药和敏感 MTB *katG* 基因突变特征

Table 3 Mutation characteristics of *katG* gene of INH resistance and sensitive MTB

<i>katG</i> 突变位点	碱基变化	INH 耐药突变菌株数( $n = 122, \%$ )	INH 敏感突变菌株数( $n = 530, \%$ )
315	AGC-AGT	2(1.64)	0(0)
	AGC-ACC	69(56.56)	10(1.89)
	AGC-AAC	7(5.74)	2(0.38)
	AGC-GGC	0(0)	1(0.19)
127	CAG-CCG	0(0)	1(0.19)
138	AAC-GAC	1(0.82)	1(0.19)
142	GAC-GCC	1(0.82)	0(0)
335	ATC-ACC	0(0)	2(0.38)
461	CAG-CCG	1(0.82)	0(0)
735	GAC-GCC	0(0)	1(0.19)
315 + 315	AGC-ACC + AGC-AGA	1(0.82)	0(0)
	AGC-ACC + AGC-ATC	1(0.82)	0(0)
315 + 317	AGC-ACC + ATC-GTC	1(0.82)	0(0)
合计	-	84(68.85)	18(3.40)

2.4 *ahpC* 突变特征 7 株发生了 *ahpC* 基因突变的菌株中,5 株为 INH 耐药株,突变形式分别为

- 48G-A, - 52C-T, - 52C-T, - 54C-T, - 81C-T; 2 株为全敏感株,突变形式分别为 - 52C-T、- 81C-T + - 54C-T。*ahpC* 在耐药株中的突变比率(4.10%)高于敏感株(0.38%) ( $\chi^2 = 9.662, P = 0.002$ )。见表 4。

表 4 INH 耐药和敏感 MTB *ahpC* 基因突变特征

Table 4 Mutation characteristics of *ahpC* gene of INH resistance and sensitive MTB

<i>ahpC</i> 突变位点	碱基变化	INH 耐药突变菌株数( $\%, n = 122$ )	INH 敏感突变菌株数( $\%, n = 530$ )
- 48	G-A	1(0.82)	0(0)
- 52	C-T	2(1.64)	1(0.19)
- 54	C-T	1(0.82)	0(0)
- 81	C-T	1(0.82)	0(0)
- 81 + - 54	C-T + C-T	0(0)	1(0.19)
合计	-	5(4.10)	2(0.38)

2.5 *inhA*、*kasA* 与 *fabG1* 的突变特征 3 株(占 0.46%)发生 *inhA* 基因突变菌株中,突变位点均为 *inhA-15C*→*T*, 其中 2 株为 INH 耐药株,1 株为 INH 敏感株;11 株发生 *fabG1* 突变菌株中,1 株为 *fabG1-8* 位点突变,10 株为 *fabG1-15* 位点突变,均为 INH 敏感株。4 株(0.61%)发生 *kasA* 基因突变菌株中,3 株为 INH 耐药株,突变位点均为 *kasA312*,1 株为 INH 敏感株,突变位点为 *kasA121*, 在 INH 耐药株中 *kasA* 突变比例高于敏感株( $\chi^2 = 5.074, P = 0.024$ )。见表 5。

2.6 不同基因型 MTB INH 耐药相关常见突变位点比较 652 株 MTB 复合群菌株中,432 株为北京基因型,220 株为非北京基因型。两种基因型菌株中,突变比例最高的位点均为 *katG315*,北京株、非北京株中 *katG315* 突变率最高,分别为 18.75% (81/432)、4.55% (10/220),两种基因型菌株突变位点分布比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 32.507, P = 0.003$ ),其中 *katG* 突变位点分布比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 16.253, P = 0.039$ )。见表 6。

**表 5** INH 耐药和敏感 MTB *inhA*、*kasA* 与 *fabG1* 基因突变特征

**Table 5** Mutation characteristics of *inhA*, *kasA* and *fabG1* genes of INH resistance and susceptible MTB

突变位点	碱基变化	INH 耐药突变菌株数 (% , n = 122)	INH 敏感突变菌株数 (% , n = 530)	$\chi^2$	P
<i>inhA</i>		2(1.64)	1(0.19)	1.940	0.164
<i>inhA</i> -15	C-T	2(1.64)	1(0.19)		
<i>kasA</i>		3(2.46)	1(0.19)	5.074	0.024
<i>kasA</i> 312	GGC-AGC	3(2.46)	0(0)		
<i>kasA</i> 121	AGG-AAG	0(0)	1(0.19)		
<i>fabG1</i>		0(0)	11(2.08)	1.476	0.224
<i>fabG1</i> -8	T-C	0(0)	1(0.19)		
<i>fabG1</i> -15	C-T	0(0)	10(1.89)		

**表 6** 不同基因型 MTB INH 耐药相关基因位点的分布构成

**Table 6** Distribution constitution of MTB INH resistance-related gene loci in different genotypes of MTB

序号	突变位点	北京株 (n = 432)		非北京株 (n = 220)	
		菌株数	突变率 (%)	菌株数	突变率 (%)
<i>katG</i>		90	20.83	12	5.45
315		81	18.75	10	4.55
127		1	0.23	0	0
138		2	0.46	0	0
142		1	0.23	0	0
335		0	0	2	0.91
461		1	0.23	0	0
735		1	0.23	0	0
315 + 315		2	0.46	0	0
315 + 317		1	0.23	0	0
<i>ahpC</i>		4	0.93	3	1.36
-48		0	0	1	0.45
-52		2	0.46	1	0.45
-54		0	0	1	0.45
-81		1	0.23	0	0
-81 + -54		1	0.23	0	0
<i>inhA</i>		2	0.46	1	0.45
-15		2	0.46	1	0.45

### 3 讨论

INH 是临床常用的一线抗结核药物,通过使 MTB *katG* 基因编码的过氧化氢 - 过氧化物酶活性下降而杀菌<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>发现,导致 INH 耐药的主要

影响基因为 *katG*、*ahpC* 与 *inhA*,其中 *katG* 基因占突变基因的 80.31%。Isakova 等<sup>[9]</sup>研究发现,91.2% 的 INH 耐药突变发生于 *katG* 基因,7% 发生于 *inhA* 基因,1.8% 发生于 *ahpC* 基因。本研究对 652 株 MTB 进行全基因组测序,结果显示,127 株发生基因突变。INH 耐药基因型与表型的符合率为 90.03% (587/652),比例法药敏检测 INH 耐药与基因测序检测基因突变之间的结果一致率不高,与国内相关研究<sup>[10-11]</sup>接近,提示 INH 耐药机制可能较为复杂,在运用基于基因检测技术进行 INH 耐药的分子诊断时,应充分考虑该地区 INH 耐药基因位点的突变特征,制定适合本地区 INH 耐药基因分子诊断方法。该研究结果为 INH 耐药结核病的分子诊断方法在本地区的合理运用提供重要依据。

*katG* 基因突变会导致 INH 效用降低,甚至失活,从而导致 MTB 对 INH 耐药<sup>[12]</sup>。研究<sup>[13-14]</sup>认为,INH 耐药与 *katG*315 位点的突变具有密切关系。不同地区的耐 INH 菌株的 *katG* 基因突变率不同,突变位点也有差别。广西地区耐 INH 菌株 *katG*315 位点突变率为 63.93%,低于研究<sup>[15-16]</sup>报道的 69.74%、70.78%,与张满娥等<sup>[17]</sup>研究结果 (63.2%) 相近,高于 Luo 等<sup>[18]</sup>报道的结果 (56.1%),而 Isakova 等<sup>[9]</sup>研究结果显示,*katG* 基因突变在 INH 耐药株中的占比高达 91.2%,可见 *katG* 基因的突变比例存在明显的地区差异。本研究显示,*katG* 基因突变主要发生于 INH 耐药株中,主要突变碱基为 AGC→ACC,占 56.56%,18 株 (3.40%) 发生于 INH 敏感株,其中主要突变碱基也为 *katG*315AGC→ACC,占 1.89%。与 Georghiou 等<sup>[19]</sup>研究结论一致,INH 敏感株中 *katG*315 位点突变占 2.76% (7/254),突变类型均为 *katG*315AGC→ACC,说明该位点碱基突变形式在不同地区有一定的相似性,考虑该位点碱基突变形式可作为 *katG* 基因突变的指示位点,为 INH 耐药的分子诊断提供更强的依据。

*ahpC* 基因是过氧化氢还原酶的结构基因,其还原酶还原细胞内各种过氧化物底物,具有解毒作用。*ahpC* 位点的突变与 INH 的耐药有明确的相关性<sup>[20]</sup>。不同地区 MTB *ahpC* 基因的突变率及突变位点不同,研究<sup>[21]</sup>显示,*ahpC* 基因的突变率为 10%,未发现 *ahpC*-52C→T 位点的突变。田雨等<sup>[8]</sup>研究结果显示,*ahpC* 基因的突变率为 3.69%。王希江等<sup>[22]</sup>研究结果显示,*ahpC* 基因的突变率为 7.84%,其中 *ahpC*-52C→T 位点的突变为 0.98%。Flores-Treviño 等<sup>[23]</sup>研究显示,耐药株 *ahpC* 突变占比为 26%。本研究显示,广西地区耐 INH 菌株

*ahpC* 的突变比率为 4.10%, *ahpC*-52C→T 位点的突变在 INH 耐药株和敏感株中均有发生,说明广西地区 INH 耐药 *ahpC* 基因突变的情况具有一定特征,可依据该特征进行分子诊断技术的合理运用。

*inhA* 基因主要作用是表达烯酰脂酰载体蛋白还原酶,其作用是调控合成分枝菌酸,是结核菌细胞壁脂质的主要成分之一,参与构成结核菌细胞壁,保护结核菌。本研究结果显示,广西地区 MTB *inhA* 的突变比率为 0.46%,突变位点均为 -15C→T。该结论与相关研究<sup>[24-27]</sup>的 *inhA* 突变位点一致,但突变比例远低于文献报道,考虑不同地区的 *inhA* 基因突变呈现出不同特点,也可能与本地区 MTB 表型耐药水平较低有关。此外,本研究未发现 *inhA* 基因突变与 MTB 的 INH 耐药表型存在关联性,与相关研究<sup>[8-9,20,28]</sup>报道的 *inhA* 会影响 MTB 的 INH 耐药表型结果不一致,可能是由于地域因素和样本量的影响所致,后续有待于对本地区 *inhA* 的突变情况与 MTB 发生 INH 耐药的相关性做进一步的系统研究。*kasA* 基因参与分枝菌酸的生物合成,其作为分枝杆菌细胞壁的一种组成成分,构成保护性的细胞壁。本研究中 *fabG1* 基因只出现于 INH 敏感株中,与相关研究<sup>[29]</sup>报道 *fabG1* 基因影响 INH 耐药结果不一致,考虑目前 *kasA* 与 *fabG1* 相关研究较少,可对这两个位点开展进一步深入研究,以进一步明确 INH 的耐药分子机制。

北京基因型是多数国家与地区的优势菌株,与耐多药结核(MDR-TB)的关联性较为密切,需要各地的卫生保健系统引起重视<sup>[30]</sup>。本研究发现 *katG* 基因突变的分布在北京基因型和非北京基因型菌株中存在差异。Gupta 等<sup>[31]</sup>研究表明,北京型菌株与 *katG*315 位点的特异性耐药突变有明显的关联性;Zhang 等<sup>[32]</sup>研究中国耐多药 MTB,发现北京基因型菌株中 *katG* 突变的频率高于非北京菌株;一项对中国 MTB 基因分析的研究结果表明,*katG*315 位点突变在北京型中的比例高于非北京型<sup>[33]</sup>。

本研究通过全基因测序技术探讨广西地区 MTB INH 耐药的分子机制,发现本地区 INH 耐药菌株基因突变多发生于 *katG* 基因的 315 位点,*katG*、*ahpC* 与 *kasA* 基因突变与异烟肼表型耐药具有相关性,不同基因型与 *katG* 基因的突变具有相关性。本研究较为全面地探讨并分析了广西地区 INH 耐药的分子特征,为该地区耐药结核病的分子诊断和治疗提供一定的科学依据。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [EB/OL]. (2016-10-12)[2022-09-20]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250441>.
- [2] Pham DD, Fattal E, Tsapis N. Pulmonary drug delivery systems for tuberculosis treatment[J]. Int J Pharm, 2015, 478(2): 517-529.
- [3] Anon. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(4 Pt 1): 1376-1395.
- [4] Myers J, Sepkowitz K. HIV/AIDS and TB[M]//Heggenhougen HK. International Encyclopedia of Public Health. Oxford: Academic Press, 2008: 421-430.
- [5] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 67-70.  
Zhao YL, Pang Y. Laboratory testing protocols for tuberculosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 67-70.
- [6] De Almeida IN, Da Silva Carvalho W, Rossetti ML, et al. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: preliminary study[J]. BMC Res Notes, 2013, 6: 561.
- [7] Niki M, Niki M, Tateishi Y, et al. A novel mechanism of growth phase-dependent tolerance to isoniazid in *Mycobacteria* [J]. J Biol Chem, 2012, 287(33): 27743-27752.
- [8] 田丽, 周伟, 黄星, 等. 中国异烟肼耐药结核分枝杆菌基因突变特征分析[J]. 中国防痨杂志, 2022, 44(4): 354-361.  
Tian L, Zhou W, Huang X, et al. Analysis of gene mutation characteristics of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2022, 44(4): 354-361.
- [9] Isakova J, Sovkhozova N, Vinnikov D, et al. Mutations of *rpoB*, *katG*, *inhA* and *ahp* genes in rifampicin and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Kyrgyz Republic[J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 22.
- [10] 董启珍, 赵承杰, 吴晓茹. 基因芯片技术在新发涂阳肺结核患者结核杆菌菌种鉴定及药敏试验中的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(7): 1024-1028.  
Dong QZ, Zhao CJ, Wu XR. Application of gene chip technology in strain identification and drug sensitivity test of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with new smear positive pulmonary tuberculosis [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2021, 31(7): 1024-1028.
- [11] 王兆芬, 申秀丽, 李斌, 等. 青海地区结核分枝杆菌异烟肼耐药相关基因突变特征[J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(1): 71-76.  
Wang ZF, Shen XL, Li B, et al. Characteristics of the gene mutations related to the isoniazid-resistance of *Mycobacterium tuberculosis* from Qinghai area [J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2019, 46(1): 71-76.
- [12] Ahmad B, Idrees M, Ahmad K, et al. Molecular characterisation of isoniazid resistant clinical isolates of *Mycobacterium tu-*

- berculosis from Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan[J]. J Pak Med Assoc, 2017, 67(8): 1224–1227.
- [13] Mo L, Zhang W, Wang J, et al. Three-dimensional model and molecular mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and isoniazid-resistant *KatG* mutants[J]. Microb Drug Resist, 2004, 10(4): 269–279.
- [14] Sethi S, Yadav R, Singh S, et al. GenoType MTBDRplus assay for screening and characterization of isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from India[J]. Lett Appl Microbiol, 2017, 65(5): 373–380.
- [15] 徐国超, 王延乾, 朱明武, 等. 结核分枝杆菌基因组变异及其耐药调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(8): 940–942, 958.  
Xu GC, Wang YQ, Zhu MW, et al. Examination of the genomic variation and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Pathogen Biology, 2019, 14(8): 940–942, 958.
- [16] Fenner L, Egger M, Bodmer T, et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(6): 3047–3053.
- [17] 张满娥, 黄文滨, 卢志华, 等. 福建省龙岩市 411 例肺结核患者对利福平和异烟肼耐药状况的研究[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(1): 54–59.  
Zhang ME, Huang WB, Lu ZH, et al. Study on resistance to rifampicin and isoniazid in 411 cases of pulmonary tuberculosis in Longyan City, Fujian Province[J]. Chinese Journal of Anti-tuberculosis, 2020, 42(1): 54–59.
- [18] Luo D, Chen Q, Xiong GC, et al. Prevalence and molecular characterization of multidrug-resistant *M. tuberculosis* in Jiangxi province, China[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 7315.
- [19] Georghiou SB, Seifert M, Catanzaro D, et al. Frequency and distribution of tuberculosis resistance-associated mutations between Mumbai, Moldova, and Eastern Cape[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(7): 3994–4004.
- [20] Norouzi F, Moghim S, Farzaneh S, et al. Significance of the coexistence of non-codon 315 *katG*, *inhA*, and *oxyR-ahpC* intergenic gene mutations among isoniazid-resistant and multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: a report of novel mutations[J]. Pathog Glob Health, 2022, 116(1): 22–29.
- [21] Jagielski T, Brzostek A, van Belkum A, et al. A close-up on the epidemiology and transmission of multidrug-resistant tuberculosis in Poland[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34(1): 41–53.
- [22] 王希江, 谭云洪, 贺文从, 等. 结核分枝杆菌中利福平和异烟肼耐药相关基因突变与耐药水平的相关性研究[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(3): 248–254.  
Wang XJ, Tan YH, He WC, et al. The correlation between rifampicin and isoniazid resistance-related gene mutations and resistance level in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2021, 43(3): 248–254.
- [23] Flores-Treviño S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, et al. Characterization of phenotypic and genotypic drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a city in Mexico[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2015, 33(3): 181–185.
- [24] Bang DD, Andersen PH, Andersen AB, et al. Isoniazid-resistant tuberculosis in Denmark: mutations, transmission and treatment outcome[J]. J Infect, 2010, 60(6): 452–457.
- [25] 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.
- [26] Aung WW, Ei PW, Nyunt WW, et al. Phenotypic and genotypic analysis of anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(5): 494–499.
- [27] 许榕青, 李丹, 林银霞, 等. 基因芯片技术检测结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性临床应用评价[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(1): 43–48.  
Xu RQ, Li D, Lin YX, et al. Evaluation for clinical application effect of gene chip for detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2017, 33(1): 43–48.
- [28] Tilahun M, Shimelis E, Wogayehu T, et al. Molecular detection of multidrug resistance pattern and associated gene mutations in *M. tuberculosis* isolates from newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients in Addis Ababa, Ethiopia[J]. PLoS One, 2020, 15(8): e0236054.
- [29] Chaidir L, Ruesen C, Dutilh BE, et al. Use of whole-genome sequencing to predict *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in Indonesia[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 16: 170–177.
- [30] Cerezo-Cortés MI, Rodríguez-Castillo JG, Hernández-Pando R, et al. Circulation of *M. tuberculosis* Beijing genotype in Latin America and the Caribbean[J]. Pathog Glob Health, 2019, 113(8): 336–351.
- [31] Gupta A, Sinha P, Nema V, et al. Detection of Beijing strains of MDR *M. tuberculosis* and their association with drug resistance mutations in *katG*, *rpoB*, and *embB* genes[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 752.
- [32] Zhang ZJ, Lu J, Liu M, et al. Genotyping and molecular characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China[J]. J Infect, 2015, 70(4): 335–345.
- [33] 高敏, 杨婷婷, 李桂莲, 等. 基于全基因组测序的我国耐多药结核分枝杆菌耐药突变特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(5): 770–775.  
Gao M, Yang TT, Li GL, et al. Analysis on drug resistance-associated mutations of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* based on whole-genome sequencing in China [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2020, 41(5): 770–775.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:秦翔翔,蓝如东,覃慧芳,等. 广西地区结核分枝杆菌异烟肼耐药基因突变特征分析[J]. 中国感染控制杂志, 2023, 22(3): 280–286. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20233443.

Cite this article as: QIN Yi-xiang, LAN Ru-shu, QIN Hui-fang, et al. Mutation characterization of isoniazid resistance genes of *Mycobacterium tuberculosis* in Guangxi region[J]. Chin J Infect Control, 2023, 22(3): 280–286. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233443.