

抗利福平结核分枝杆菌的多药耐药性调查

匡铁吉 金关甫 宋 萍

李伟霞 王仲元

(解放军三〇九医院 北京 100091)

关键词 结核分枝杆菌, 利福平抗性, 多药耐药性

分类号 R378.91

结核分枝杆菌生长十分缓慢, 常规药敏试验从取得临床标本到报告结果, 通常需要 40~50d, 少数标本甚至需要更长时间^[1]。采用 Bactec 系统做结核菌药敏试验, 从取得临床标本到报告结果也需要 2~4 周^[2]。因此, 现有的该菌药敏试验方法花费时间太长, 不能满足临床治疗和流行病学调查研究工作的需要。随着分子生物学技术迅速发展和基础研究的进步, 结核分枝杆菌对主要抗痨药物的耐药分子基础已经明了, 采用分子生物学技术快速检测该菌的耐药性已有可能^[3]。由于分枝杆菌与异烟肼和链霉素抗药性有关的基因突变涉及到多个基因或大范围 DNA 区段, 这类耐药突变基因的检测需要使用多对引物以扩增所有可能发生突变的 DNA 区段, 然后再行鉴定。因而上述耐药基因的检测无论从技术操作或费用上讲都有困难, 目前尚不能广泛应用^[4,5]。而与分枝杆菌利福平抗性有关的基因突变仅发生在 86 个碱基长度的 DNA 片段内, 故快速检测结核分枝杆菌的利福平耐药基因已成为现实^[6]。但利福平单药耐药性的快速检测意义有限, 结核病临床治疗和流行病学调查中最需要了解致病菌是否为多药耐药菌。故结核分枝杆菌利福平抗性与多药耐药性之间有无关联, 为防痨界专家与学者所关注。本研究对 236 株临床分离的结核菌的利福平耐药性与多药耐药性的关系进行了调查, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 试验菌株

236 株结核分枝杆菌是从 236 例住院肺结核患者痰标本中分离到的, 菌株分离时间从 1995 年 3 月至 1996 年 6 月。

1.2 试验药物

用于敏感试验的抗痨药物包括: R、H、SM、EB、O、KM、PAS、PZA, 共 8 种。其中利福平的耐药界限浓度值为 $2\mu\text{g}/\text{ml}$, 其它抗痨药物使用的浓度详见有关报道^[7,8]。

1.3 药敏试验培养基

本研究采用匡氏琼脂培养基作结核菌药敏试验, 其制作方法参见有关报道^[9,10]。

1.4 药敏试验方法

所有受试菌株均在匡氏琼脂斜面上划线接种, 36°C 培养 3 周。取 3 周斜面培养物研磨均匀后配制成 1mg 湿菌 / ml 的原液, 依次稀释至 10^{-2}mg 湿菌 / ml 管。分别取 10^{-2}mg 湿菌 / ml 管接种试验培养基斜面, 每支斜面接种量为 10^{-3}mg 湿菌。

本文作者还有: 裴宁、陈红兵。

收稿日期: 1997-03-26

1.5 结果观察

已接种的药敏试验斜面置 35℃ 培养。每周观察一次结果, PZA 试验斜面观察 4 周, 其余抗痨药物试验斜面观察 3 周。详细记录菌落数、菌落大小和形态。

2 结果

236 株临床分离结核菌中, 利福平耐药 172 株, 占 72.9%, 与国内许多专家的检测结果基本一致。172 株利福平耐药结核菌, 除 1 株耐异烟肼和利福平外, 其余菌株均耐三种或三种以上抗痨药物(见表 1)。

表1 利福平耐药结核菌株的耐药谱分析

菌株耐药性	株数	百分率(%)
耐1药	0	0.0
耐2药	1	0.6
耐3药	4	2.3
耐3药以上	167	97.1
合 计	172	100.0

表2 利福平敏感株的耐药谱分布

菌株耐药性	株数	百分率(%)
全敏	8	12.5
耐1药	8	12.5
耐2药	24	37.5
耐3药	8	12.5
耐3药以上	16	25.0
合 计	64	100.0

236 株临床分离结核菌中, 利福平敏感 64 株。在这些利福平敏感株中, 有 8 株结核菌对所试抗痨药物均敏感, 占 12.5%; 耐 1 药和 2 药的分别有 8 株和 24 株, 合占 50%; 耐 3 种和 3 种以上抗痨药物的有 24 株, 占 37.5%(详见表 2)。8 例耐 1 药的菌株中 4 株耐 H, 4 株耐 EB; 24 例耐 2 药的菌株中 12 株耐 HS, 8 株耐 SE, 4 株耐 HE。

3 讨论

多药耐药结核菌株的出现和传播, 是全球结核病发病率上升的主要原因之一, 并已成为当今结核病临床和防治工作中的难题^[11]。多药耐药株的快速鉴别对结核病临床治疗和流行病学调查均具有重要意义。目前采用分子生物学技术快速鉴别多药耐药结核菌株, 只能通过多组 PCR 分别扩增主要抗痨药物耐药突变点的相应基因片段这一途径, 工作量大, 成本高, 且可靠性不令人满意。

许多专家的研究工作已经证实, 结核病临床分离株对利福平的耐药性, 与结核菌核糖核酸多聚酶结构基因发生突变有关^[12]。这类突变属于单碱基错义突变, 主要发生在核糖核酸多聚酶的 β 亚基上, 即 rPOB 基因。而且 rPOB 基因突变集中在约 86 个碱基长度的 DNA 区段内, 故通过 PCR-SSCP 技术可将 97% 以上的利福平耐药株快速鉴别出来^[13]。利福平作为一种重要的一线抗痨药物, 快速鉴定利福平耐药结核菌株很有必要, 但其实际意义有限。

本研究结果表明: 利福平耐药株中有 99.4% 的菌株为多药耐药株。172 株利福平耐药结核菌中只有 1 株为利福平和异烟肼双耐药株, 其余菌株均耐 3 种以上抗痨药物。严格讲, 耐利福平和异烟肼这一双耐药株, 也可划归为多药耐药株。因此, 本研究结果说明结核菌株利福平耐药性可以作为多药耐药的标记, 其特异性高于 99%。

本研究结果表明: 利福平敏感株约占结核菌临床分离株中的 27%, 利福平敏感株中多药耐药株占 37.5%。这部分多药耐药株约占分离菌株中多药耐药株总数的 1/9, 目前只有采用常规方法才能加以鉴别。这一结果表明: 结核菌株中大约 89% 的多药耐药株可通过利福平耐药性的检测而得到鉴别。

由于结核菌利福平耐药性可通过 PCR-SSCP 技术快速检测, 由于 99% 以上的结核菌利福平耐药株为多药耐药株, 因此通过 PCR-SSCP 技术快速鉴别多药耐药结核菌是可行的, 它可将 89% 的多药耐药株快速鉴别出来。

参 考 文 献

- [1] Jerome I T, Judith R R, Karen K *et al.* *J Clin Microbiol*, 1996, **34**(3): 680~685.
- [2] 姜 平. 中华结核和呼吸杂志, 1993, **16**(2): 106~107.
- [3] Ying Zhang, Douglas Y. *J Antimicrobiol Chemther*, 1994, **34**: 313~319.
- [4] Sheldon M, Gil H B, Philip S *et al.* *The Journal of Infectious Diseases*, 1995, **171**: 954~960.
- [5] Bonnie B P, Jennifer L M, Jack J C *et al.* *J Clin Microbiol*, 1994, **32**(6): 1542~1546.
- [6] Christian W A, Teresa A F, John M H *et al.* *J Clin Microbiol*, 1995, **33**(3): 556~561.
- [7] 匡铁吉, 王利平. 中国防痨通讯, 1990, **12**(3): 115~117.
- [8] 匡铁吉, 王利平. 中国防痨通讯, 1990, **12**(1): 17~19.
- [9] 匡铁吉, 王利平. 微生物学通报, 1990, **17**(1): 17~22.
- [10] 匡铁吉, 宋 萍, 王利平, 等. 微生物学报, 1995, **35**(4): 298~302.
- [11] 阚冠卿, 张立兴, 屠德华, 等. 中国防痨杂志, 1994, **16**(1): 1~2.
- [12] Lincoln P M, Jack T C, Thomas M S. *Antimicrobiol Agents Chemother*, 1994, **38**(4): 805~811.
- [13] Amalio T, Paul I, Francine M *et al.* *lancet*, 1993, **341**: 647~650.

AN INVESTIGATION ON MULTIPLE DRUG RESISTANCE OF THE RIFAMPIN RESISTANT STRAINS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Kuang Tieji Jin Guanfu Song Ping Li Weixia Wang Zhongyuan

(309th Hospital of PLA, Beijing 100091)

Abstract The correlation between rifampin resistance and multiple drug resistance in 236 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* was investigated in this thesis. It has found that 99.4% of the strains with rifampin resistance were multidrug-resistant strains and 89% of the multidrug-resistant strains were resistant to rifampin. This result showed that the rifampin resistance of *Tuberculosis baccilli* could be used as the marker of multidrug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, Rifampin resistance, Multidrug resistance