

宁波地区结核分枝杆菌基因突变位点确证及与异烟肼、利福平耐药关系研究

徐峰¹, 饶跃峰^{2*}, 张幸国^{3*}, 朱育银⁴, 车洋⁵(1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.浙江大学医学院附属第一医院药学部, 杭州 310003; 3.浙江大学医学院附属第一医院北仑分院, 浙江 宁波 315800; 4.中国科学院大学宁波华美医院肺科, 浙江 宁波 315010; 5.宁波市疾病预防控制中心结核病防治所, 浙江 宁波 315010)

摘要: 目的 阐明宁波地区初治肺结核患者结核分枝杆菌 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因突变特征, 深入分析基因突变与异烟肼、利福平耐药关系, 为临床抗结核治疗提供科学依据。方法 采用 1%比例法对 2 455 例结核分枝杆菌临床分离株进行药敏检测, 对其中的耐药菌株和部分全敏菌株提取 DNA, PCR 扩增, 对耐药菌株 *katG*、*inhA*、*rpoB* 基因测序, 分析 3 种基因特征及基因突变与单耐药、耐多药关联性。结果 2 455 例结核分枝杆菌临床分离株中, 发现 108 例耐药结核分枝杆菌, 其中单耐药 75 例(单耐异烟肼 51 例, 利福平 24 例), 单耐药率为 3.05%; 33 例耐多药, 耐多药率为 1.34%。33 例耐多药菌株中, 5 例发生 *inhA* 基因错义突变, 突变率为 15.15%(5/33), *rpoB* 基因 450 位点(*ser450leu*)突变率为 51.52%(17/33), *katG* 基因 315 位点(*ser315thr*)突变率为 87.88%(29/33), 463 位点(*arg463leu*)突变率为 78.79%(26/33)。24 例单耐利福平菌株中有 17 例发生 *rpoB* 基因错义突变, 突变率为 70.83%(17/24), 主要在 446 位点(*lys446lysarg*)发生, 该位点突变率为 45.83%(11/24)。51 例单耐异烟肼菌株中有 45 例发生 *katG* 基因错义突变, 突变率为 88.23%(45/51), 315 位点(*ser315thr*)突变率为 72.55%(37/51), 463 位点(*arg463leu*)突变率为 64.71%(33/51); 22 例发生 *inhA* 基因错义突变, 突变率为 43.14%(22/51), 145 位点(*val145valgly*)突变率为 27.45%(14/51); 5 例发生 *rpoB* 基因错义突变, 突变率为 9.80%(5/51), 位点较分散。另外, 108 例耐药菌株中, 有 11 例菌株发生 *rpoB*、*katG*、*inhA* 多基因联合突变, 且在大多数位点发生错义突变, 突变率为 10.18%(11/108)。结论 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因在 450(*ser450leu*)、315(*ser315thr*)、446(*lys446lysarg*)、463(*arg463leu*)、145(*val145valgly*)等位点突变和宁波地区结核分枝杆菌对异烟肼、利福平耐药密切相关, 其中 *rpoB*、*inhA* 基因的主要突变位点和突变频率存在明显地区差异。

关键词: 结核分枝杆菌; 基因; 突变位点; 耐药机制

中图分类号: R969.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)20-2511-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.20.014

引用本文: 徐峰, 饶跃峰, 张幸国, 等. 宁波地区结核分枝杆菌基因突变位点确证及与异烟肼、利福平耐药关系研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2511-2515.

Identification of Gene Mutation Sites of *Mycobacterium Tuberculosis* and the Relationship Between Isoniazid and Rifampicin Resistance in Ningbo

XU Feng¹, RAO Yuefeng^{2*}, ZHANG Xingguo^{3*}, ZHU Yuyin⁴, CHE Yang⁵(1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China; 3.Beilun Branch of the First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Ningbo 315800, China; 4.Lung Department, Hwa Mei Hospital, University of Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315010, China; 5.Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To elucidate the mutation characteristics of *rpoB*, *katG* and *inhA* genes of *Mycobacterium tuberculosis* in newly treated pulmonary tuberculosis patients in Ningbo, and to analyze the relationship between gene mutation and drug resistance to isoniazid and rifampicin, so as to provide scientific basis for clinical anti-tuberculosis treatment. **METHODS** Drug susceptibility of 2 455 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* was detected by 1% ratio method. DNA was extracted from drug-resistant strains and amplified by PCR. The *katG*, *inhA* and *rpoB* genes of drug-resistant strains were sequenced. The three gene characteristics and the association of gene mutations with single drug resistance and multi-drug resistance were analyzed. **RESULTS** Among 2 455 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, 108 cases were found to be resistant to *Mycobacterium tuberculosis*, including 75 cases of single drug resistance (*inh* 51 cases, *rfp* 24 cases), the single drug

基金项目: 宁波市自然科学基金项目(2018A610405)

作者简介: 徐峰, 男, 硕士生, 副主任药师 Tel: (0574)83870999 E-mail: xufnb@21cn.com *通信作者: 饶跃峰, 男, 博士, 主任药师 Tel: (0571)87236531 E-mail: raoyf@126.com 张幸国, 男, 博士, 主任药师 Tel: (0574)86100266 E-mail: zdy6616@126.com

resistance rate was 3.05%; 33 cases of multi-drug resistance, the multi-drug resistance rate was 1.34%. Among the 33 multi-drug resistance strains, 5 of them had mutations of *inhA* gene, the mutation rate was 15.15%(5/33). The mutation rate of *rpoB* gene at 450 locus(*ser450leu*) was 51.52%(17/33), the mutation rate of *katG* gene 315 locus(*ser315thr*) was 87.88%(29/33), the mutation rate of 463 locus(*arg463leu*) was 78.79%(26/33). Among the 24 rifampicin resistant strains, 17 of them had mutations in *rpoB* gene, the mutation rate was 70.83%(17/24), mainly at the 446 locus(*lys446lysarg*), the mutation rate was 45.83%(11/24). Among 51 isoniazid-resistant strains, 45 cases had missense mutation of *katG* gene, the mutation rate was 88.23%(45/51), the mutation rate of 315 locus(*ser315thr*) was 72.55%(37/51), the mutation rate of 463 locus(*arg463leu*) was 64.71%(33/51), 22 cases had *inhA* gene missense mutation, the mutation rate was 43.14%(22/51), the mutation rate of 145 locus(*val145valgly*) was 27.45%(14/51), 5 cases had *rpoB* gene missense, the mutation rate was 9.80%(5/51). In addition, 11 of 108 drug-resistant strains had combined mutations of *rpoB*, *katG* and *inhA* genes, and missense mutations occurred at most sites, the mutation rate was 10.18%(11/108). **CONCLUSION** The mutations of *rpoB*, *katG* and *inhA* genes at 450 locus(*ser450leu*), 315 locus(*ser315thr*), 446 locus(*lys446lysarg*), 463 locus(*arg463leu*), 145 locus(*val145valgly*) are closely related to the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin in Ningbo. The main mutation sites and mutation frequencies of *rpoB* and *inhA* genes are significantly different.

KEYWORDS: *Mycobacterium tuberculosis*; gene; mutation site; drug resistance mechanism

结核是目前全球发病率和病死率较高的一种传染病,严重影响人民健康,是中国重点防治疾病之一。研究表明,结核分枝杆菌是耐药结核病的病原体,耐药基因突变是结核分枝杆菌产生耐药最主要的分子机制^[1]。国外多位学者^[2-5]报道了国家及地区耐利福平结核分枝杆菌的 *rpoB* 基因突变特点以及耐异烟肼结核分枝杆菌的 *katG*、*inhA* 等基因突变特点。其中,孟加拉国耐利福平菌株 *rpoB* 基因 531 位点突变频率为 57.4%^[2],缅甸为 63.6%^[3];喀麦隆学者研究发现该地结核分枝杆菌 *inhA* 基因-15 位点突变率 50%^[4]。白俄罗斯学者 Arjomandzadegan 等^[5]研究表明,耐多药结核和广泛耐药结核在 *katG* 基因 463 位点(*arg463leu*)突变率分别为 57.8%和 59.2%。国内多位学者^[6-9]也相继开展了吉林省、徐州市、扬州市、广西百色等地区结核分枝杆菌异烟肼耐药或利福平耐药基因突变研究。其中,吉林省耐多药菌株 *katG* 基因 315 位点突变率为 58.18%^[6];徐州市结核分枝杆菌 *rpoB* 基因主要突变位点为 531 位点,并同时存在 516, 526, 531 位点突变^[7];扬州市结核分枝杆菌 *katG* 基因 315 位点突变率为 79%, *inhA* 基因-15 位点突变率 22.9%^[8];广西百色地区结核分枝杆菌 *katG* 基因 315 位点突变率为 66.7%,出现新突变位点 279 和 427, *inhA* 基因-5 位点突变率为 13.3%^[9]。可见,不同国家、地区结核分枝杆菌相关基因突变位点、突变频率的研究结论并不一致。本研究通过 DNA 直接测序法对宁波地区初治肺结核患者耐药结核分枝杆菌 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因突变位点进行确证,分析研判本地区初治肺结核患者异烟肼、利福平耐药产生与基因突变位点的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

2017 年 1 月—2018 年 12 月宁波市结核病定点医院实验室检测的结核分枝杆菌临床分离株 2 455 例,菌株的分离培养按照《结核病诊断实验室检验规程》^[10]相关要求进行,药物敏感性检测采用世界卫生组织/国际防痨和肺病联合会(WHO/IUATLD)《耐药监测指南》推荐的 1%比例法进行,对药敏测定的耐药菌株,经编号后待基因测序。

1.2 仪器与试剂

EDC-810 型普通 PCR 仪(苏州东胜兴业科学仪器有限公司); NanoDrop 5 000 微量紫外可见分光光度计(美国 Thermo Fisher); DYY-2C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司); Labnet Sub System 70 电泳槽(美国莱伯特); ABI3730xl 测序仪(美国 Thermo Fisher); BD-III 紫外透射观察仪(北京菁美瑞科技有限公司)。

DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司,批号: S7828); PCR 试剂 Boost 热启动 taq 酶(欧凯生物公司,批号: M106S2); 测序试剂 BigDye Terminator v3.1(ABI 公司,批号: 4337458); 电泳试剂 B548101-0500(生工生物公司,批号: E927KA9715)等。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取及光度值测定 采用 DP348 基因组 DNA 提取试剂盒,按其说明书流程进行 DNA 提取,最后将溶液收集到离心管中, -20 °C 保存备用。采用微量紫外可见分光光度计测定所提取的结核分枝杆菌 DNA 光密度值,并将浓度稀释 10 倍备用。

1.3.2 PCR 扩增 引物序列: *rpoB* 基因分 7 段上、

下游引物, *katG* 基因分 4 段上、下游引物, *inhA* 基因分 2 段上、下游引物, 结果见表 1~3。

PCR 反应体系: 混合物总体积 30 μ L, 提取的 DNA 2 μ L, PCR Mix(含 taq 酶、buffer、dntp, Mg^{2+})15 μ L, 引物(10 μ mol)每条 1 μ L, 加蒸馏水至 30 μ L。

PCR 反应条件: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min; 变性 94 $^{\circ}$ C 15 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 15 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 35 个循环; 末次延伸 72 $^{\circ}$ C 3 min。

表 1 *rpoB* 基因扩增结果

Tab. 1 Amplification results of *rpoB* gene

引物名称	引物序列	引物位置	产物长度/bp
rpoB_1_2F	GTTTAGTTGCGTGCCTGAG	65	691
rpoB_1_2R	CAATGGTCTCGTCAAGTACA	755	
rpoB_2_1F	GACGAGTGCAAAGACAAGG	539	685
rpoB_2_1R	AGCGGACCAGATATTCGAT	1223	
rpoB_3_1F	CGTCGGTGCCTATAAGGTCAA	1111	670
rpoB_3_1R	GGCGGTACAGTACACGATCT	1780	
rpoB_4_1F	CCAGAACAAACCGCTGTGCG	1504	727
rpoB_4_1R	GCAAGTGCCGTGGTTGGAC	2230	
rpoB_5_1F	GAAGAAAGCGGCGTCATCG	2114	653
rpoB_5_1R	GGCAACTCGTCCTCGTCCTC	2766	
rpoB_6_1F	GCGTGCCATCTTCGGTGAG	2644	672
rpoB_6_1R	GAGCGGGCGTGGATCTTGT	3315	
rpoB_7_1F	AGCCGAACGCCATTGTGT	3081	688
rpoB_7_1R	GAGCACGTAACCTCCCTTCCC	3768	

表 2 *katG* 基因扩增结果

Tab. 2 Amplification results of *katG* gene

引物名称	引物序列	引物位置	产物长度/bp
katG_1_1F	GGTCTATGCTCTGATTGTTTCG	112	741
katG_1_1R	TTCTCCAGATCCCGCTTAC	852	
katG_2_1F	CAAGAAGAAGTACGGCAAGAAG	652	731
katG_2_1R	GCGTGATCCGCTCATAGAT	1382	
katG_3_1F	GGCAATACACCGCCAAGGA	1251	712
katG_3_1R	TCCAGCACGGCAAAGGATT	1962	
katG_4_1F	AAGTCGGGTGGGAGGTCA	1704	762
katG_4_1R	GGCGGGTTGTGGTTGATC	2465	

表 3 *inhA* 基因扩增

Tab. 3 Amplification results of *inhA* gene

引物名称	引物序列	引物位置	产物长度/bp
inhA_1_1F	TCCGAGGATGCGAGCTATA	113	607
inhA_1_1R	ACCTGTTGACCGACTCCAA	719	
inhA_2_1F	TCCAAGGGCATCCACATCTC	548	501
inhA_2_1R	CGAACGACAGCAGCAGGAC	1048	

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳 用微量移液器将扩增产物加样至 1%琼脂糖凝胶板样品槽内, 100 V 电泳 10 min, 电泳完毕后, 取出凝胶, 用凝胶成像仪观察, 并拍照保存。

1.3.4 测序及结果分析 扩增后产物经洗脱、离心, 取 2 μ L 纯化产物至上海派森诺生物科技有限公司进行序列分析, 测序结果与 NCBI 上的 *rpoB*、*katG* 和 *inhA* 基因标准序列进行对比, 运用 Chromas 和 Sequence Analysis 软件进行分析。

2 结果

2.1 药敏结果

2 455 例结核分枝杆菌临床分离株中, 经药敏检测发现 108 例耐药结核分枝杆菌, 其中单耐药 75 例(单耐异烟肼 51 例, 单耐利福平 24 例), 单耐药率 3.05%; 33 例耐多药, 耐多药率 1.34%。菌株编号为耐多药结核分枝杆菌(耐异烟肼和利福平)33 例, 编号 1~33; 单耐利福平结核分枝杆菌 24 例, 编号 34~57; 单耐异烟肼结核分枝杆菌 51 例, 编号 58~108。非耐药(全敏)结核分枝杆菌 10 例, 编号 109~118。

2.2 DNA 光密度值

经测定, 118 份样品在 260 nm 处, 光密度值范围为 0.208~1.894; 在 280 nm 处, 光密度值范围为 0.119~1.149; 在 230 nm 处, 光密度值范围为 0.02~0.90。A₂₆₀/A₂₈₀ 比值范围 1.59~1.91, DNA 提取良好, 基本上无 RNA 或蛋白质污染; A₂₆₀/A₂₃₀ 比值范围 1.99~80.45, 无碳水化合物、有机溶剂等污染。表明 DNA 提取过程可行, 浓度适宜, 可用于进一步实验。

2.3 基因的扩增及琼脂糖凝胶电泳

菌株 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因组 DNA 经 PCR 扩增, 各组扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 均出现明亮扩增产物条带, 表明扩增产物良好, 见图 1。

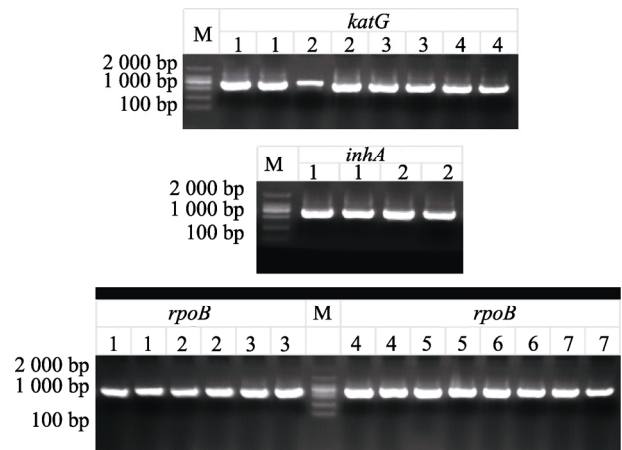


图 1 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因组 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis map of PCR products of *rpoB*, *katG* and *inhA* genomes

2.4 基因突变和菌株关联分析

2.4.1 *rpoB* 基因 33 例耐多药菌株中有 17 例菌株 *rpoB* 基因错义突变发生在 450 位点(*ser450leu*), 突变率为 51.52%(17/33)。24 例单耐利福平菌株有 17 例菌株发生 *rpoB* 基因错义突变, 突变率为 70.83%(17/24), 主要在 446 位点(*lys446lysarg*)发生, 该位点突变率为 45.83%(11/24), 见表 4。51 例单耐异烟肼菌株中有 5 例菌株发生 *rpoB* 基因错义突变, 突变率为 9.80%(5/51), 位点较分散; 15 例菌株在 1075 位点(*ala1075ala*)发生 *rpoB* 基因同义突变, 2 例菌株在 441 位点(*ser441#*)发生 *rpoB* 基因无义突变。全敏菌株中有 4 例菌株 *rpoB* 基因发生突变, 其中 1 例菌株分别在 430(*leu430pro*)、445(*his445gln*)位点发生 *rpoB* 基因错义突变, 3 例菌株在 1075 位点(*ala1075ala*)发生同义突变。

2.4.2 *katG* 基因 33 例耐多药菌株中有 29 例菌株 *katG* 基因错义突变发生在 315 位点(*ser315thr*), 突变率为 87.88%(29/33), 26 例发生在 463 位点(*arg463leu*), 突变率为 78.79%(26/33)。24 例单耐利福平菌株有 3 例菌株 *katG* 基因在 463 位点(*arg463leu*)发生错义突变, 突变率为 12.50%(3/24)。51 例单耐异烟肼菌株中有 45 例发生 *katG* 基因错义突变, 突变率为 88.23%(45/51), 其中 37 例发生在 315 位点(*ser315thr*), 突变率为 72.55%(37/51), 33 例发生在 463 位点(*arg463leu*), 突变率为 64.71%(33/51)。全敏菌株中有 3 例菌株在 463(*arg463leu*)位点发生 *katG* 基因错义突变, 见表 4。

2.4.3 *inhA* 基因 33 例耐多药菌株中有 5 例发生 *inhA* 基因错义突变, 突变率为 15.15%(5/33), 错义突变位点较分散, 分别发生在 194(*lle194thr*)、268(*leu268trp*)和 145 (*val145valgly*)位点。24 例单耐利福平菌株未发现 *inhA* 基因突变。51 例单耐异烟肼菌株中有 22 例发生 *inhA* 基因错义突变, 突

率为 43.14% (22/51), 其中 14 例发生在 145 位点(*val145valgly*), 突变率为 27.45% (14/51), 见表 4。全敏菌株中有 5 例发生 *inhA* 基因错义突变, 位点较分散。

2.4.4 多基因联合突变 33 例耐多药菌株中有 4 例耐多药菌株发生 *rpoB*、*katG*、*inhA* 多基因联合错义突变, 突变率为 12.12%(4/33), 主要突变位点: 450(*ser450leu*)、315(*ser315thr*)、463(*arg463leu*)。24 例单耐利福平菌株未发生多基因联合突变。51 例单耐异烟肼菌株中有 7 例菌株发生 *rpoB*、*katG*、*inhA* 多基因联合错义突变, 突变率为 13.73% (7/51), 主要突变位点: 315(*ser315thr*)、463 (*arg463leu*)、145(*val145valgly*)位点。1 例全敏菌株发生多基因联合突变。

3 讨论

有研究发现 *rpoB* 基因相关位点突变导致氨基酸的改变, 使 RNA 聚合酶的三级结构发生改变, 从而导致利福平与结核分枝杆菌 RNA 聚合酶的亲和力和明显下降, 最终导致细菌对利福平耐药^[11-12]。Hui 等^[13]研究表明, 结核分枝杆菌对异烟肼耐药以 *katG*、*inhA* 突变较为常见, >80%的耐药由这 2 个基因突变引起。

本研究发现宁波地区初治肺结核患者结核分枝杆菌 *rpoB* 基因主要在 450 位点(*ser450leu*)发生错义突变, 其次是 446 位点(*lys446lysarg*)和 408 位点(*pro408proarg*), 只有 2 例菌株分别在 531 位点(*asp531asn*)和 534 位点(*val534ala*)发生错义突变, 主要突变位点与国外文献报道并不一致, 但也属于结核耐药相关基因突变和多态性数据库(www.tbdreamdb.com)记载突变位点。另外, 除单耐利福平菌株和耐多药菌株外, 单耐异烟肼菌株也存在 *rpoB* 基因的错义突变, 表明该基因突变已经不仅局限于对利福平耐药的结核分枝杆菌范

表 4 基因突变和菌株关联分析

Tab. 4 Analysis of the relationship between gene mutation and strains

菌株类别	例数	<i>rpoB</i> 错义突变			<i>katG</i> 错义突变			<i>inhA</i> 错义突变		
		主要位点	例数	突变率/%	主要位点	例数	突变率/%	主要位点	例数	突变率/%
耐利福平、异烟肼	33	<i>ser450leu</i>	17	51.52	<i>ser315thr</i>	29	87.88	位点分散		
					<i>arg463leu</i>	26	78.79			
单耐利福平	24	<i>lys446lysarg</i>	11	45.83	<i>arg463leu</i>	3	12.50	—	—	—
单耐异烟肼	51	位点分散			<i>ser315thr</i>	37	72.55	<i>val145valgly</i>	14	27.45
					<i>arg463leu</i>	33	64.71			
全敏	10	位点分散			<i>arg463leu</i>	3	33.33	位点分散		

畴。另外, *katG* 基因主要在 315 位点(*ser315thr*), 463 位点(*arg463leu*)发生错义突变, 突变位点与文献报道基本一致, 但突变频率不尽相同。*inhA* 基因主要在 145 位点(*val145valgly*)发生错义突变, 与文献报道的常见-15、-17 位并不一致^[14]。另外还发现有 11 例耐药菌株(4 例耐多药, 7 例单耐异烟肼)发生 *rpoB*、*katG*、*inhA* 多基因联合突变, 占耐药结核分枝杆菌总数 10.18%(11/108), 对异烟肼和利福平耐药性明显增强。由此可见, 本地区初治肺结核患者结核分枝杆菌 *rpoB*、*katG*、*inhA* 基因在 450(*ser450leu*)、315(*ser315thr*)、446(*lys446lysarg*)、463(*arg463leu*)、145(*val145valgly*)等主要位点突变和本地区结核分枝杆菌对异烟肼、利福平耐药密切相关, 其中 *rpoB*、*inhA* 基因的主要突变位点和突变频率存在明显地区差异。

此外, 研究表明^[15], 2012—2014 年宁波地区复治组肺结核患者耐多药率几乎达到了初治组的 8 倍。可见, 初治肺结核患者治疗效果与复治、耐药肺结核发生息息相关, 初治肺结核患者接受合理、有效的药物治疗是结核病防控的关键。本研究入选的 118 例结核分枝杆菌临床分离株中, 有 105 例菌株既是基因型耐药, 又有表型耐药菌株, 占总数 88.98%, 表明基因耐药菌株大多数均有表型耐药现象发生。由于基因测序相对于临床上常用的痰培养+药敏检测具有更加快速、准确特点, 对于临床医师、药师在初治肺结核患者早期诊断、制定个体化用药方案、后期随访以及区域性的流动人口结核病患者耐药筛查等方面具有重要指导意义。

REFERENCES

- [1] 杨松, 陈耀凯. 结核分枝杆菌基因多样性及其耐药特点的研究进展[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(3): 152-154.
- [2] RAHIM Z, NAKAJIMA C, RAQIB R, et al. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh [J]. Tuberculosis, 2012, 92(6): 529-534.

- [3] AUNG W W, EI P W, NYUNT W W, 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.
- [4] TEKWU E M, SIDZE L K, ASSAM J P A, 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(1): 1-10.
- [5] ARJOMANDZADEGAN M, OWLIA P, RANJBAR R, et al. Prevalence of mutations at codon 463 of *katG* gene in MDR and XDR clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Belarus and application of the method in rapid diagnosis [J]. Acta Microbiol et Immunol Hung, 2011, 58(1): 51-63.
- [6] YANG X J, ZHANG W Y, ZHANG L F, et al. Mutation characteristics of the *katG* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Jilin province [J]. Chin J Antituberc(中国防痨杂志), 2017, 39(8): 902-904.
- [7] 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]. 广东医学, 2017, 38(2): 223-224, 228.
- [8] 王金富, 曾方林, 戴洁. 扬州市结核分枝杆菌异烟肼耐药基因突变分析[J]. 医药前沿, 2018, 8(30): 313-314.
- [9] 韦红玉, 隆昕颖, 凌俊, 等. 广西百色地区结核分枝杆菌异烟肼耐药基因特征分析[J]. 重庆医学, 2016, 45(1): 93-95.
- [10] 中国防痨协会基础专业委员会. 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.
- [11] MATSUO M, HISHINUMA T, KATAYAMA Y, et al. Mutation of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) promotes hVISA-to-VISA phenotypic conversion of strain Mu3 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(9): 4188-4195.
- [12] IMPERIALE B R, CATALDI A A, MORCILLO N S. Rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by multiplex allele-specific polymerase chain reaction [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(4): 496-501.
- [13] HUI M M, CHAN E W C, CHIN M L, et al. Genotypic *rpoB* and *gyrA* profiles for detection of rifampicin and fluoroquinolone susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates directly from clinical sputum specimens [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 34(2): 186-187.
- [14] ZHANG J X, WU X Q. Research progress in the mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chin J Antituberc(中国防痨杂志), 2015, 37(11): 1150-1155.
- [15] XU F, ZHU Y Y, CHE Y, et al. Analysis of drug resistance trend of patients infected by *Mycobacterium tuberculosis* in Ningbo [J]. Chin J Nosocomiol(中华医院感染学杂志), 2015, 25(19): 4438-4440, 4452.

收稿日期: 2019-08-21

(本文责编: 李艳芳)