

# 氟喹诺酮类药物耐结核分枝杆菌基因突变位点的测序分析

张晨晨, 郭卉欣, 赵雨川, 彭柯皓, 徐镠粤, 余美玲, 魏文静

广东省结核病控制中心结核病研究所, 广东 广州 510630

**摘要:**目的 通过对体外诱导产生和临床分离的氟喹诺酮类耐药结核分枝杆菌进行全基因组测序,从基因水平上探索结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制。方法 在体外采用药物浓度梯度诱导法,在罗氏培养基上将结核分枝杆菌标准菌株 H37Rv 诱导成标准耐左氧氟沙星的菌株及高水平耐药菌株,收集并保存各代的诱导菌株及无药对照菌株。筛选临床分离株中的氟喹诺酮类耐药菌株,并用液体微孔板法对上述诱导菌株和临床分离菌株进行 14 种抗结核药物敏感性检测,然后进行全基因组测序及分析。结果 对左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型进行分析发现,结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物产生耐药性可能与 *gyrB* (Ala504Thr, Asp461Asn)、*gyrA* (Ala90Val)、*PE\_PGRS31* (Ala395fs)、*panB* (Asp184\_Ala187del)、*aroD* (Asp61Asn)、*devS* (Gly348Arg) 和 *rv3446c* (Ala178Thr) 基因突变有关;临床分离菌株全基因组关联分析检测到 17 个可能与氟喹诺酮类药物耐药相关的新突变位点,分别为 *gyrA* (p. Glu21Gln, p. Gly668Asp, p. Ser95Thr, p. Glu213Asp, p. His280Arg, p. Ala384Val)、*gyrB* (er132Ala, p. Met291Ile)、*PE\_PGRS31* (p. Ser365Phe, p. Pro254Leu, p. Thr252Ile, p. Val352Ile)、*rv3446c* (p. Arg284Pro, p. Leu389Phe, p. Ala164Val) 和 *devS* (p. Val307Ala, p. Ile283Thr)。结论 本研究构建的左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型为探索结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制提供了理想的生物模型;全基因组测序从基因水平上分析了结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制,所得与氟喹诺酮类药物耐药相关的新突变位点仍需进一步的研究与验证。

**关键词:**结核分枝杆菌;左氧氟沙星;氟喹诺酮类药物;耐药;基因突变

中图分类号:R52 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2025)08-1469-08

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202406205

## Sequencing analysis of gene mutation sites of fluoroquinolone – resistant mycobacterium tuberculosis

ZHANG Chen – chen, GUO Hui – xin, ZHAO Yu – chuan, PENG Ke – hao, XU Liu – yue,

YU Mei – ling, WEI Wen – jing

Research Institute of Tuberculosis, Centre for Tuberculosis Control of Guangdong Province, Guangzhou, Guangdong 510630, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) resistance to fluoroquinolones (FQs) drugs at the genetic level, the whole genome sequencing of fluoroquinolone – resistant Mtb induced in vitro and clinical isolates was conducted. **Methods** Mtb standard strain H37Rv was induced into standard levofloxacin (LFX) resistant strain and high – level drug – resistant strain in LJ medium by concentration gradient induction method in vitro. The induced strains and drug – free control strains of each generation were collected and preserved. FQs – resistant strains in clinical isolates were screened, and the sensitivity of the induced strains and clinical isolates to 14 anti – tuberculosis drugs was detected by liquid microplate method, and then the whole genome was sequenced and analyzed. **Results** The analysis of LFX – resistant Mtb model found that the resistance of Mtb to FQs drugs may be related to gene mutations, *gyrB* (Ala504Thr, Asp461Asn), *gyrA* (Ala90Val), *PE\_PGRS31* (Ala395fs), *panB* (Asp184\_Ala187del), *aroD* (Asp61Asn), *devS* (Gly348Arg) and *rv3446c* (Ala178Thr). GWAS analysis of clinical isolates detected 17 new mutation sites that may be related to FQs drug resistance, namely *gyrA* (p. Glu21Gln, p. Gly668Asp, p. Ser95Thr, p. Glu213Asp, p. His280Arg, p. Ala384Val), *gyrB* (er132Ala, p. Met291Ile), *PE\_PGRS31* (p. Ser365Phe, p. Pro254Leu, p. Thr252Ile, p. Val352Ile), *rv3446c* (p. Arg284Pro, p. Leu389Phe, p. Ala164Val)

**基金项目:**国家自然科学基金(82202562);广东省基础与应用基础研究基金(2024A1515030056);广州市科技计划项目(202201010785);广东省医学科学技术研究基金(B2022243);广东省结核病临床研究中心(2020B1111170014);广东省科技计划专项(2021B1212030003)

**作者简介:**张晨晨(1987—),女,硕士,主管技师,研究方向:结核分枝杆菌的耐药性检测

**通信作者:**魏文静, E – mail: wenjingwei2014@163.com

*anddevS*(p. Val307Ala, p. Ile283Thr). **Conclusion** The LFX - resistant Mtb model constructed in this study provides an ideal biological model for exploring the mechanism of Mtb drug resistance to FQs. Whole genome sequencing has analyzed the mechanism of Mycobacterium tuberculosis resistance to fluoroquinolones from the gene level, and the obtained new mutation sites related to fluoroquinolone resistance still need to be further studied and verified.

**Keywords:** Mycobacterium tuberculosis; Levofloxacin; Fluoroquinolones; Drug resistance; Gene mutation

结核病 (Tuberculosis, TB) 是因感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 而引起的一种慢性传染病, 结核病可侵袭机体多组织、器官, 其中以肺部结核病最为常见。临床治疗肺结核以西药为主, 近年来, 随着耐药结核病, 尤其是耐多药结核病 (multidrug - resistant TB, MDR - TB) 的流行, 给全球结核病防治工作提出了巨大的挑战。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 公布的《2023 年全球结核病报告》显示, 2022 年全球有 1 060 万新发结核病患者, 其中利福平耐药/耐多药结核病 (RR - /MDR - TB) 患者 41 万 (3.9%), 新患者中 RR - /MDR - TB 患者的比例为 3.3%、复治患者中的比例为 17%<sup>[1]</sup>。

氟喹诺酮类 (Fluoroquinolones, FQs) 药物是一类广谱强活性抗菌药物, 尤其是左氧氟沙星 (levofloxacin, LFX) 和莫西沙星 (Moxifloxacin, MFX), 因其较于其他一线抗结核药物耐药率更低、副作用更少、吸收快和组织透过率高而被广泛应用于治疗结核病, 同时也是 WHO 推荐的用于治疗 RR - /MDR - TB 的首选 A 组化疗抗结核药物<sup>[2]</sup>。但 Mtb 对 FQs 药物的耐药性也随之不断增加, 尽管 Mtb 对 FQs 产生临床耐药性的主要原因是 *gyrA*、*gyrB* 基因突变, 其在 FQs 临床耐药株中占比 60% ~ 90%<sup>[3]</sup>, 但仍有一部分 FQs 临床耐药株的这两个基因没有发生突变, 这表明 Mtb 中存在其他与 FQs 耐药相关的基因和机制。由于不同来源的 Mtb 的遗传背景<sup>[4]</sup> 和环境因素会对 Mtb 的基因型和耐药性产生影响, 所以目前不同国家和地区关于 Mtb 的 FQs 耐药基因突变位点、突变类型及突变频率的报道存在较大差异<sup>[3, 5-7]</sup>。为了克服上述不足并明确结核分枝杆菌在体外耐药变化的系统进化过程, 本研究以 LFX 作为诱导剂, 在体外采用药物浓度梯度诱导法构建了 Mtb 对 LFX 耐药模型并从临床样本中分离获得了氟喹诺酮类耐药结核分枝杆菌菌株, 结合全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS) 技术, 期望能发现更多新的 Mtb 对 FQs 耐药相关基因, 深入探索 Mtb 对 FQs 药物的耐药机制, 以促进耐药性分子诊断产品的研发与药物更新换代。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株信息** 本研究所用 Mtb 标准菌株 H37Rv 为广东省结核病控制中心参比实验室保藏菌株; FQs 耐药临床分离菌株均从本中心生物样本信息库中筛

选获得, 并用液体微孔板法进行药物敏感性试验复核。

### 1.2 体外诱导左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型

挑取 H37Rv 单克隆菌株用于实验室条件下诱导耐 LFX 的 Mtb 菌株, 该菌株视为初代菌株 P0 代。即将 P0 代菌株接种于中性罗氏培养基上进行扩大培养, 采用 WHO 推荐的改良罗氏固体药敏试验中 LFX 的临界浓度 (2.0 mg/L), 进行连续的浓度梯度稀释, 即得到不同的药浓度  $2^0$ 、 $2^{-1}$ 、 $2^{-2}$ 、 $2^{-3}$ 、 $2^{-4}$ 。同时用无药罗氏中性培养基作为对照。随后将 P0 代菌株分别接种在不同浓度的 LFX 培养基上, 37 °C 培养 4 周, 记录各浓度培养基上菌株的生长状况; 挑选生长状态较好的菌株进行下一轮传代, 所有药物浓度梯度提高 1 倍。依此类推, 筛选出每一代生长良好的菌株, 连续传代, 直至筛选的阳性克隆株的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 达到 WHO 推荐的 LFX 耐药临界浓度。为进一步探索 Mtb 获得高水平 LFX 耐药的机制, 继续给予上述诱导成功的标准菌株  $2^1$ 、 $2^2$ 、 $2^3$  倍药物浓度压力刺激, 从而建立 LFX 连续诱导的 Mtb 耐药动态变化模型, 这有助于分析 Mtb 在 LFX 药物压力下的遗传进化和耐药机制。在 -80 °C 条件下, 保留每一代产生的诱导菌株及对照菌株用于后续实验分析。

**1.3 药物敏感性试验** 用结核分枝杆菌药敏试剂盒 (广东珠海, 贝索, 货号: BC8001) 对本研究中的所有诱导菌株和临床分离菌株进行药物敏感性试验, 检测其 MIC 及交叉耐药情况。试剂盒所含 14 种抗结核药物及 MIC 值分别为利福平 (rifampicin, RIF, 1.0 mg/L)、异烟肼 (isoniazid, INH, 0.2 mg/L)、乙胺丁醇 (ethambutol, EMB, 5.0 mg/L)、吡嗪酰胺 (pyrazinamide, PZA, 100 mg/L)、氧氟沙星 (ofloxacin, OFX, 2.0 mg/L)、左氧氟沙星 (levofloxacin, LFX, 2.0 mg/L)、链霉素 (streptomycin, SM, 2.0 mg/L)、莫西沙星 (moxifloxacin, MFX, 0.5 mg/L)、卡那霉素 (kanamycin, KM, 5.0 mg/L)、阿米卡星 (amikacin, AKM, 1.0 mg/L)、对氨基水杨酸 (para - aminosalicylic acid, PAS, 2.0 mg/L)、丙硫异烟胺 (prothionamide, PTO, 2.5 mg/L)、卷曲霉素 (capreomycin, CAP, 2.0 mg/L) 和利福布丁 (rifabutin, RBU, 0.5 mg/L)。所有实验操作严格按照试剂盒说明书执行, 37 °C, 静置培养 10 d 后读取试验结果。

**1.4 全基因组测序及分析** 参考已有研究,用十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取并纯化结核分枝杆菌基因组 DNA<sup>[8]</sup>。为了保证测序数据的准确性和可靠性,使用 TruSeq DNA 试剂盒(Illumina, Inc.)对菌株的基因组 DNA 进行处理,构建用于全基因组测序的 PCR-free DNA 文库,所有操作步骤严格按照说明书执行,随后使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行测序。

①测序原始数据质控:原始序列的平均 Q20 rate 为 98.0%。采用 FASTP 软件(V0.20.0)对原始数据(Raw data)进行过滤,得到有效数据(clean data)的平均长度为 142 bp, Q20 rate 为 98.9%。

②基因组比对分析:用 Snippy 软件(v4.4.3)将 clean data 比对到 H37Rv 参考基因组(NC\_000962.3),然后进行突变分析。每个样本平均生成 520Mb 的数据,平均测序深度  $230\times$ , Mtb 基因组覆盖度为 99.5%。

③遗传距离分析:经 Snippy 分析获得目的基因组的所有的核苷酸突变,包含单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、短的核苷酸插入或缺失突变等,所用参数均为默认参数。除去基因组上的重复区域(包括 PE-PPE、PE-PCRS 和转座子序列等),通过 IQ-Tree(<http://www.iqtree.org>)对全基因组的 SNP 比对进行系统发育分析。

所有测序原始数据已上传至 Sequence Read Archive(SRA)公共数据库, BioProject 编号为 PRJNA883019 和 PRJNA866200。

**1.5 体外诱导左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型的遗传进化分析** 体外诱导耐 LFX 菌株耐药进化分析步骤如下:①背景去除:利用 BCF 工具将第一株菌株的突变列表(VCF 文件)合并到两组样本中,提取两组样本中的突变位点作为背景位点。然后使用 bedtool 从剩余菌株的原始突变列表中去掉这些位点的突变,即获得去除背景后的突变列表。②对于每株耐药菌株,从已去除背景后的突变列表中提取突变频率  $\geq 1\%$  且突变序列数(read number)  $\geq 5$  的位点,并对所有菌株的突变位点进行合并,用 freebayes(参数设置:  $-p2 - P - -min - coverage 10 - -min - repeat - entropy 1.0 - q13 - m60 - -strict - vcf - -report - monomorphic - C5 - F 0.05$ )从 BAM 文件中提取每个样本在每个位点的基因型、测序深度、野生型序列数和突变序列数。

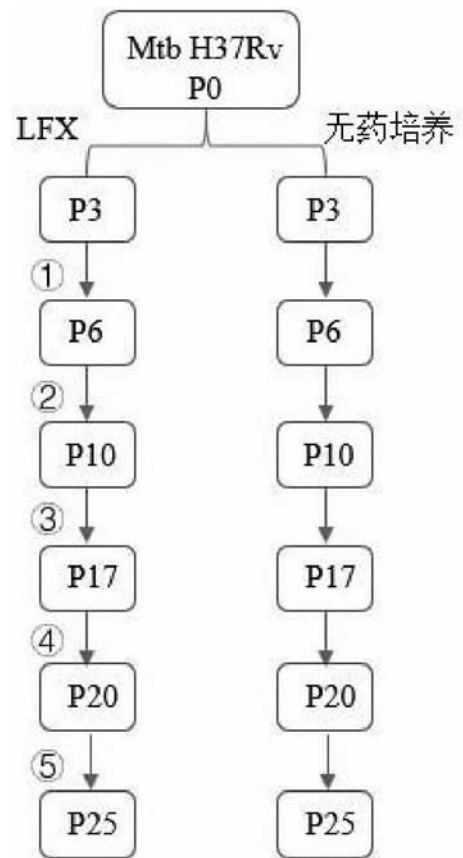
**1.6 全基因组关联分析** 本研究采用全基因组关联分析(Genome-wide association study, GWAS)方法成功鉴定了结核分枝杆菌在药物压力下产生的核苷酸变异和基因座<sup>[9-10]</sup>。使用 Pyseer(v1.3.9)对临床

分离的 Mtb 进行 GWAS 分析,输入文件包括:包含所有临床样本基因组变异(包括 SNPs 和短的缺失突变)的 VCF 文件、记录所有临床分离株耐药表型的文本文件和由嵌入脚本 phylogeny\_distance 计算的成对距离矩阵。所采用的两种检测方法分别为:对单个位点(locus test)进行检测,参数设置为  $- -max - dimensions 6 - -min - af 0.01, lrt - pvalue$  阈值为  $4.49e - 5$ ;对单个基因(burden test)进行检测,参数设置为  $- -max - dimensions 6 - -min - af 0.001, lrt - pvalue$  阈值为  $9.44e - 6$ ,最后通过 R 语言的 qqman(v3.2.3)软件包绘制分析结果。

## 2 结果

### 2.1 体外构建左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型

为了进一步分析和验证基因突变与 Mtb 对 LFX 耐药之间的关系,随着 LFX 浓度的增加,在体外诱导产生了不同耐药水平的 LFX 耐药菌株。在诱导过程中,保留每一代诱导菌株的阳性克隆及其无药罗氏培养基上的对照菌株,建立 Mtb 对 LFX 耐药的动态模型(图 1),有助于分析在药物压力下基因进化和 Mtb 菌



注:① $2^{-4}$ 、 $2^{-3}$ 、 $2^{-2}$ 、 $2^{-1}$ 、 $2^0$ 倍临界 MIC,②临界 MIC,③ $2^1$ 倍临界 MIC,④ $2^2$ 倍临界 MIC,⑤ $2^3$ 倍临界 MIC。

图 1 体外构建左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型示意图  
Fig. 1 Schematic diagram of induced levofloxacin resistant mycobacterium tuberculosis model in vitro

株的耐药机制。P3 代 Mtb 对 LFX 产生耐药性,但菌落生长状态较差,继续在罗氏含药培养基上进行连续培养至 P6 代,直至菌落生长状态与无药对照组相似。为稳定 LFX 耐药性状,继续培养四代,至 P10 代获得 LFX 临界耐药的 Mtb 菌株。为进一步研究 Mtb 获得高水平 LFX 耐药的机制,继续对 P10 代菌株进行高浓度 LFX 的诱导培养,最终获得了对应耐高浓度 LFX 的 Mtb 菌株,分别为 P17、P20 和 P25 代。

2.2 左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型的药物敏感

表 1 诱导的左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌对 14 种抗结核药物的敏感性(mg/L)

Table 1 Susceptibility of induced LFX-resistant Mtb to 14 anti-tuberculosis drugs (mg/L)

菌株	INH	SM	EMB	OFX	MFX	AKM	KM	CAP	PTO	PAS	RBU	RIF	LFX	PZA
	MIC = 0.2	MIC = 2	MIC = 5	MIC = 2	MIC = 0.5	MIC = 1	MIC = 5	MIC = 2	MIC = 2.5	MIC = 1	MIC = 0.5	MIC = 1	MIC = 2	MIC = 100
P1	<0.025	2	1.25	1	0.25	1	2.5	1	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	<0.5	<50
P2	<0.025	<0.25	0.62	<0.25	<0.06	<0.25	1.25	<0.5	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	<0.5	<50
P3	0.2	1	2.5	2	0.5	1	5	2	<0.62	<0.5	0.25	0.5	2	<50
P4	0.2	0.5	2.5	4	1	1	2.5	2	<0.62	1	<0.12	<0.25	4	<50
P5	0.1	0.5	1.25	16	2	0.5	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	8	<50
P6	0.1	0.5	1.25	16	2	0.5	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	8	<50
P7	0.1	1	1.25	16	2	0.5	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	8	<50
P8	<0.025	<0.25	<0.31	8	1	<0.25	<0.62	<0.5	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	4	<50
P9	0.1	1	1.25	16	2	0.5	5	2	<0.62	<0.5	<0.12	0.5	8	<50
P10	0.1	1	2.5	16	2	0.5	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	8	<50
P11	0.1	1	1.25	16	2	1	2.5	2	<0.62	1	<0.12	0.5	8	<50
P12	0.5	1	2.5	16	2	1	5	2	<0.62	2	<0.12	1	8	<50
P13	0.1	1	>20	>16	>4	1	5	2	<0.62	2	0.25	1	8	<50
P14	0.1	1	1.25	8	1	1	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	4	<50
P15	<0.025	1	1.25	16	2	1	5	2	<0.62	<0.5	0.25	1	8	<50
P16	0.1	2	1.25	>16	2	1	5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	16	<50
P17	0.1	1	1.25	>16	>4	1	5	2	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	>16	<50
P18	0.2	1	2.5	>16	>4	0.5	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	0.5	>16	<50
P19	0.1	0.5	1.25	>16	>4	<0.25	2.5	1	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	>16	<50
P20	<0.025	<0.25	1.25	>16	>4	0.5	1.25	1	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	>16	<50
P21	0.2	2	2.5	16	2	0.5	2.5	2	<0.62	<0.5	<0.12	0.5	8	<50
P22	0.5	2	2.5	>16	>4	1	2.5	1	<0.62	1	<0.12	0.5	>16	<50
P23	0.05	1	1.25	>16	>4	1	2.5	1	<0.62	<0.5	<0.12	<0.25	>16	<50
P24	0.5	2	2.5	>16	>4	1	2.5	1	<0.62	<0.5	<0.12	1	>16	<50
P25	0.1	1	1.25	>16	>4	0.5	1.25	2	<0.62	1	<0.12	<0.25	>16	<50

2.3 全基因组测序分析左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型的遗传进化结果 为了确定 Mtb 进化过程中出现的与 LFX 性相关的遗传修饰,本研究对所有诱导菌株及其无药培养基上的对照菌株进行了 WGS 和生物信息学分析。结果发现,当剔除对照菌株中的突变后,随着药物浓度的增加基因突变出现逐渐累积的效应。P3 代时, *gyrB* (Ala504Thr) 和 *panB* (Asp184\_Ala187del) 基因发生突变, Mtb 即出现 LFX 耐药现象; P6 代时, *gyrB* 基因的另一个位点 (Asp461Asn) 也发生突变, 此时, Mtb 产生高浓度 LFX 耐药 (>4 倍); 至 P17 代, *gyrA* (Ala90Val)、*PE\_PGRS31* (Ala395fs)、*aroD* (Asp61Asn)、*devS* (Gly348Arg) 和 *rv3446c* (Ala178Thr) 均发生突变, Mtb 对 LFX 耐药浓度进一

步提高 (>8 倍); 至 P25 代, Mtb 未再出现其他基因突变 (表 2)。

2.4 临床分离结核分枝杆菌中新发现的与氟喹诺酮类药物耐药相关基因突变位点 为进一步了解 FQs 耐药结核分枝杆菌及其基因突变之间的关系, 本研究对本中心生物样本信息库中保存的 2016—2018 年广东省 32 个结核病耐药监测点纳入的活动性肺结核患者的阳性样本进行了筛选, 并用液体微孔板法进行药物敏感性试验复核, 最终获得 41 例 FQs 耐药的临床分离 Mtb 菌株, 药敏结果显示该临床分离株同时对 LFX、OFX 和 MFX 产生交叉耐药。全基因组测序及 GWAS 分析发现, 临床分离菌株中, 与 FQs 耐药相关的经典突变包含 *gyrA* (p. Asp94Asn, p. Asp94Gly,

表 2 全基因组测序所得左氧氟沙星耐药结核分枝杆菌模型中与耐药性相关的基因突变

Table 2 Gene mutations associated with drug resistance in LFX – resistant Mtb models obtained by whole genome sequencing

菌株	Rv0005		Rv0005		Rv0006		Rv1768	
	gyrB		gyrB		gyrA		PE_PGRS31	
	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸
P1								
P2								
P3			G1510A	Ala504Thr				
P4			G1510A	Ala504Thr				
P5			G1510A	Ala504Thr				
P6	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P7	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P8	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P9	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P10	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P11	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P12	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P13	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P14	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P15	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P16	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr				
P17	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P18	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P19	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P20	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P21	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr			C1184CG	Ala395fs
P22	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P23	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P24	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs
P25	G1381A	Asp461Asn	G1510A	Ala504Thr	C269T	Ala90Val	C1184CG	Ala395fs

菌株	Rv2225		Rv2537c		Rv3132c		Rv3446c	
	panB		aroD		devS			
	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸	核苷酸	氨基酸
P1								
P2								
P3	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P4	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P5	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P6	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P7	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P8	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P9	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P10	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P11	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P12	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P13	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P14	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P15	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P16	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P17	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P18	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P19	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P20	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P21	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del						
P22	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P23	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P24	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr
P25	CATCGCCGACGCG551C	Asp184_Ala187del	C181T	Asp61Asn	C1042G	Gly348Arg	C532T	Ala178Thr

p. Asp94Ala, p. Asp94Tyr, p. Ala90Val)、*katG* (p. Thr380Ile, p. Ser315Thr)、*embB* (p. Asp354Ala) 和 *rrs* (r. 462c > t, r. 799c > t), 其中突变率最高的是 *gyrA* p. Asp94Gly 和 *gyrA* p. Ala90Val, 分别占 29.27% 和 17.07%; 此外, 本研究还发现了 17 个可能与 FQs 耐

药相关的新突变点, 其中 *gyrA* (p. Glu21Gln 和 p. Gly668Asp) 在 41 株临床分离株中均发生了突变, *rv3446c* p. Arg284Pro、*gyrA* p. Ser95Thr 和 *PE\_PGRS31* p. Ser365Phe 的突变率较高, 分别为 53.66%、46.34% 和 17.07% (表 3)。

表 3 临床分离结核分枝杆菌中与氟喹诺酮类耐药相关基因突变

Table 3 Mutations of genes associated with FQs resistance in clinically isolated strains

突变类型	基因突变	突变菌株数量(n)	百分比(%)	
经典突变	<i>gyrA</i> p. Asp94Asn	3	7.32	
	<i>gyrA</i> p. Asp94Gly	12	29.27	
	<i>gyrA</i> p. Asp94Ala	3	7.32	
	<i>gyrA</i> p. Asp94Tyr	2	4.88	
	<i>gyrA</i> p. Ala90Val	7	17.07	
	<i>katG</i> p. Thr380Ile	1	2.44	
	<i>katG</i> p. Ser315Thr	1	2.44	
	<i>embB</i> p. Asp354Ala	1	2.44	
	<i>rrs</i> r. 462c > t	1	2.44	
	<i>rrs</i> r. 799c > t	1	2.44	
	新发突变	<i>gyrA</i> p. Glu21Gln	41	100.00
		<i>gyrA</i> p. Gly668Asp	41	100.00
		<i>gyrA</i> p. Ser95Thr	19	46.34
<i>gyrA</i> p. Glu213Asp		1	2.44	
<i>gyrA</i> p. His280Arg		1	2.44	
<i>gyrA</i> p. Ala384Val		1	2.44	
<i>gyrB</i> er132Ala		1	2.44	
<i>gyrB</i> p. Met291Ile		1	2.44	
<i>PE_PGRS31</i> p. Ser365Phe		7	17.07	
<i>PE_PGRS31</i> p. Pro254Leu		1	2.44	
<i>PE_PGRS31</i> p. Thr252Ile		1	2.44	
<i>PE_PGRS31</i> p. Val352Ile		1	2.44	
<i>rv3446c</i> p. Arg284Pro		22	53.66	
<i>rv3446c</i> p. Leu389Phe		1	2.44	
<i>rv3446c</i> p. Ala164Val	1	2.44		
<i>devS</i> p. Val307Ala	2	4.88		
<i>devS</i> p. Ile283Thr	1	2.44		

### 3 讨论

FQs 常被用于治疗各种细菌性感染, 因其具有稳定高效的抗 TB 作用, FQs 药物逐渐成为治疗 MDR-TB 的核心药物。随着 FQs 药物应用的普及, Mtb 对其耐药情况也日益严峻, 但利用已知 FQs 耐药相关目的基因进行 Mtb 快速分子耐药检测时, 仍有部分对 FQs 耐药 Mtb 菌株无法检出, 严重影响了耐药结核病的诊断和治疗进程。本研究在体外用药物浓度梯度诱导法构建了耐 LFX 的 Mtb 模型, 对诱导菌株及临床分离 Mtb 菌株进行全基因组测序及分析, 本研究确定了与 FQs 耐药相关的目的基因, 并发现了一些新的基因突变位点。

全基因组测序及分析表明, 诱导菌株中由 LFX 单一因素作用产生的基因突变包含 *gyrB* (Asp461Asn, Ala504Thr)、*gyrA* (Ala90Val)、*PE* \_

*PGRS31* (Ala395fs)、*panB* (Asp184\_Alal187del)、*aroD* (Asp61Asn)、*devS* (Gly348Arg) 和 *rv3446c* (Ala178Thr)。Mtb 中的 DNA 解旋酶是由 4 个亚基组成的 II 型拓扑异构酶, 其中 *gyrA* 和 *gyrB* 基因分别编码 2 个 A 亚基和 2 个 B 亚基, 当前公认 *gyrA* 和 *gyrB* 基因中喹诺酮耐药决定区 (Quinolone resistance determining region, QRDR) 发生突变会影响 DNA 解旋酶的亚基结构, 进而导致 FQs 耐药无法通过抑制 DNA 解旋酶进行修复和重组干扰 Mtb 的 DNA 复制、转录过程<sup>[11-13]</sup>。大部分研究认为, *gyrA* 的 QRDR 区突变是 Mtb 对 FQs 产生耐药的主要原因, 其中第 88、90、91 和 94 为氨基酸突变是与 FQs 耐药相关的最常见的基因突变位点<sup>[11, 14-16]</sup>。还有一些研究发现, Mtb 不用位点的基因发生突变, 对 FQs 产生耐药的程度也不同, *gyrA* 91 氨基酸突变可能与低水平的 FQs 耐药相关, 而 *gyrA* 94 氨基酸突变则与较高水平的 FQs 相

关<sup>[17-19]</sup>。本研究中, GWAS 分析所得临床菌株经典突变中存在 4 种 *gyrA* 94 氨基酸突变 (p. Asp94Asn, p. Asp94Gly, p. Asp94Ala, p. Asp94Tyr) 和 1 种 *gyrA* 90 氨基酸突变 (p. Ala90Val), 但是未观察到 *gyrA* 第 88 和 91 位氨基酸突变。另有研究表明, Mtb 的 *gyrB* 基因 QRDR 区突变类型较少, 检出频率低且常伴随 *gyrA* 的 QRDR 区突变<sup>[20]</sup>, 这与本研究的结果一致, 在临床分离菌株中, 本研究未检测到 *gyrB* 基因的经典突变, 但是 GWAS 分析所得 *gyrB* 基因的 2 个新发突变位点 (Ser132Ala, p. Met291Ile) 都伴随 *gyrA* p. Glu21Gln 和 *gyrA* p. Gly668Asp 突变。

因目前已知的喹诺酮类药物耐药区突变不能完全解释 Mtb 对 FQs 药物的表型耐药, 寻找与 FQs 药物耐药相关的 Mtb 新突变及其耐药机制的研究仍在不断进行。近年来, 泰国一项研究<sup>[21]</sup> 对 214 例 FQs 表型耐药菌株和 445 例 Mtb 敏感菌株进行全基因组测序分析发现了 3 个与 FQs 药物耐药相关的新基因 *recC*、*rv2005c* 和 *PPE59*。本研究中, 除 *gyrA* 和 *gyrB* 基因外, 本研究还另外检测到 3 个可能与 FQs 药物耐药相关的新基因及其突变位点, 分别为 *PE\_PGERS31* (p. Ser365Phe, p. Pro254Leu, p. Thr252Ile, p. Val352Ile)、*rv3446c* (p. Arg284Pro, p. Leu389Phe, p. Ala164Val) 和 *devS* (p. Val307Ala, p. Ile283Thr), 但未发现 *recC*、*rv2005c* 和 *PPE59* 基因及相关突变, 这可能与各地流行的 Mtb 菌株的遗传背景及环境差异有关。

综上所述, 本研究在体外对 H37Rv 进行诱导, 构建了 LFX 耐药的 Mtb 模型, 并通过全基因组测序技术及分析, 发现了 17 个可能与 FQs 药物耐药的新的基因突变位点, 这为更好的理解 Mtb 对 FQs 药物的耐药机制提供了理论依据, 同时也有助于新型耐药分子诊断技术的开发和抗结核新药物的研制, 但是本研究所得与 FQs 药物耐药的新的基因突变位点仍需进一步的实验验证。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

## 参考文献

[1] 舒薇, 刘宇红. 世界卫生组织《2023 年全球结核病报告》解读 [J]. 结核与肺部疾病杂志, 2024, 5(1): 15-19.  
Shu W, Liu YH. Interpretation of WHO global tuberculosis report 2023 [J]. Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2024, 5(1): 15-19. (In Chinese)

[2] World Health Organization. WHO treatment guidelines for isoniazid-resistant tuberculosis: Supplement to the WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis [EB/OL]. [2025-02-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531412/>.

[3] Avalos E, Catanzaro D, Catanzaro A, et al. Frequency and geographic distribution of *gyrA* and *gyrB* mutations associated with

fluoroquinolone resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates: a systematic review [J]. PLOS One, 2015, 10(3): e0120470.

- [4] Castro RAD, Ross A, Kamwela L, et al. The genetic background modulates the evolution of fluoroquinolone-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Molecular Biology and Evolution, 2020, 37(1): 195-207.
- [5] Farhat MR, Jacobson KR, Franke MF, et al. Gyrase mutations are associated with variable levels of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2016, 54(3): 727-733.
- [6] Hoshide M, Qian L, Rodrigues C, et al. Geographical differences associated with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in nine gene targets among resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(5): 1322-1329.
- [7] Huo FM, Zhang FZ, Xue Y, et al. Increased prevalence of levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China is associated with specific mutations within the *gyrA* gene [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2020, 92: 241-246.
- [8] Jiang Q, Liu Q, Ji L, et al. Citywide transmission of multidrug-resistant tuberculosis under China's rapid urbanization: a retrospective population-based genomic spatial epidemiological study [J]. Clinical Infectious Diseases, 2020, 71(1): 142-151.
- [9] Wei W, Zhao Y, Zhang C, et al. Whole-genome sequencing and transcriptome-characterized *in vitro* evolution of aminoglycoside resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Microbial Genomics, 2023, 9(5): mgen001022.
- [10] Lees JA, Galardini M, Bentley SD, et al. Pyseer: a comprehensive tool for microbial pangenome-wide association studies [J]. Bioinformatics, 2018, 34(24): 4310-4312.
- [11] Malik S, Willby M, Sikes D, et al. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations [J]. PLOS One, 2012, 7(6): e39754.
- [12] Anderson VR, Perry CM. Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection [J]. Drugs, 2008, 68(4): 535-565.
- [13] Noredin AM, Elkhathib WF, Cunnion KM, et al. Cumulative clinical experience from over a decade of use of levofloxacin in community-acquired pneumonia: critical appraisal and role in therapy [J]. Drug, Healthcare and Patient Safety, 2011, 3: 59-68.
- [14] 张海晴, 陈效友, 周冬青, 等. 结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变与氟喹诺酮类药物体外最低抑菌浓度的关系 [J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(14): 4-8, 14.  
Zhang HQ, Chen XY, Zhou DQ, et al. Relationship between *gyrA* gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and the minimum inhibitory concentration of fluoroquinolones *in vitro* [J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2021, 25(14): 4-8, 14. (In Chinese)
- [15] Kabir S, Tahir Z, Mukhtar N, et al. Fluoroquinolone resistance and mutational profile of *gyrA* in pulmonary MDR tuberculosis patients [J]. BMC Pulmonary Medicine, 2020, 20(1): 138.

- Journal ; Journal of the Canadian Thoracic Society, 2022, 2022; 3769134.
- [10] Cao ZJ, Liu Y, Zhang Z, et al. Pirfenidone ameliorates silica - induced lung inflammation and fibrosis in mice by inhibiting the secretion of interleukin - 17A [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2022, 43(4): 908 - 918.
- [11] Wollin L, Maillet I, Quesniaux V, et al. Antifibrotic and anti - inflammatory activity of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib in experimental models of lung fibrosis [J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014, 349(2): 209 - 220.
- [12] 柳彤彤, 韩燕星, 蒋建东, 等. 矽肺药物治疗的研究进展 [J]. 药理学学报, 2023, 58(5): 1196 - 1203.
- Liu TT, Han YX, Jiang JD, et al. The developments of silicosis drugs [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2023, 58(5): 1196 - 1203. (In Chinese)
- [13] Guse AH. Calcium mobilizing second messengers derived from NAD [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2015, 1854(9): 1132 - 1137.
- [14] Wang LQ, Zhao MY, Qian R, et al. Nicotinamide mononucleotide ameliorates Silica - Induced lung injury through the Nrf2 - Regulated glutathione metabolism pathway in mice [J]. Nutrients, 2022, 15(1): 143.
- [15] Ma J, Wang JQ, Sun RT, et al. Adeno - Associated Virus - Mediated dickkopf - 1 gene transduction reduces Silica - Induced oxidative stress and silicosis in mouse lung [J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2024.
- [16] Ni R, Ji XY, Cao T, et al. Nicotinamide mononucleotide protects septic hearts in mice via preventing cyclophilin F modification and lysosomal dysfunction [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2024.
- [17] Song Q, Zhou XF, Xu KX, et al. The safety and antiaging effects of nicotinamide mononucleotide in human clinical trials: an update [J]. Advances in Nutrition, 2023, 14(6): 1416 - 1435.
- [18] Zhang R, Chen S, Wang ZW, et al. Assessing the effects of nicotinamide mononucleotide supplementation on pulmonary inflammation in male mice subchronically exposed to ambient particulate matter [J]. Environmental Health Perspectives, 2023, 131(7): 77006.
- [19] Fang TT, Yang JY, Liu L, et al. Nicotinamide mononucleotide ameliorates senescence in alveolar epithelial cells [J]. MedComm, 2021, 2(2): 279 - 287.
- [20] Liu J, Hou WX, Zong ZY, et al. Supplementation of nicotinamide mononucleotide diminishes COX - 2 associated inflammatory responses in macrophages by activating kynurenine/AhR signaling [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2024, 214: 69 - 79.
- [21] Mo YF, Yue M, Yim LY, et al. Nicotinamide mononucleotide impacts HIV - 1 infection by modulating immune activation in T lymphocytes and humanized mice [J]. EBioMedicine, 2023, 98: 104877.
- [22] You YN, Gao Y, Wang H, et al. Subacute toxicity study of nicotinamide mononucleotide via oral administration [J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 604404.
- [23] Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, et al. Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop [J]. Journal of Autoimmunity, 2012, 39(4): 259 - 271.
- [24] Shtraichman O, Blanc PD, Ollech JE, et al. Outbreak of autoimmune disease in silicosis linked to artificial stone [J]. Occupational Medicine (Oxford, England), 2015, 65(6): 444 - 450.
- [25] Mills KHG. IL - 17 and IL - 17 - producing cells in protection versus pathology [J]. Nature Reviews Immunology, 2023, 23(1): 38 - 54.
- [26] Wen Z, Qiu L, Ye Z, et al. The role of Th/Treg immune cells in osteoarthritis [J]. Frontiers in Immunology, 2024, 15: 1393418.
- [27] 周馨蓓, 张伟, 巢杰. 基于单细胞 RNA 测序和空间转录组测序分析矽肺中巨噬细胞差异基因及其功能 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(12): 1350 - 1358.
- Zhou XB, Zhang W, Chao J. Macrophage differential genes and their functions in silicosis based on single cell RNA sequencing and spatial transcriptome sequencing [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(12): 1350 - 1358. (In Chinese)
- [28] Korbecki J, Kojder K, Simińska D, et al. CC chemokines in a tumor: a review of Pro - Cancer and Anti - Cancer properties of the ligands of receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(21): 8412.

收稿日期: 2024-11-10

(上接第 1475 页)

- [16] Momen G, Aainouss A, Lamaammal A, et al. Molecular characterization of mutations associated with resistance to second line drugs in *Mycobacterium tuberculosis* patients from Casablanca, Morocco [J]. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2021, 63: e19.
- [17] Sirgel FA, Warren RM, Streicher EM, et al. gyrA mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(5): 1088 - 1093.
- [18] Von Groll A, Martin A, Jureen P, et al. Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in gyrA and gyrB [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(10): 4498 - 4500.
- [19] Yin XM, Yu ZX. Mutation characterization of gyrA and gyrB genes in levofloxacin - resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China [J]. Journal of Infection, 2010, 61(2): 150 - 154.
- [20] Uddin M, Ather MF, Nasrin R, et al. Correlation of gyr mutations with the minimum inhibitory concentrations of fluoroquinolones among multidrug - resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Bangladesh [J]. Pathogens, 2021, 10(11): 1422.
- [21] Chaiyachatt P, Chairprasert A, Nonghanphithak D, et al. Whole - genome analysis of drug - resistant *Mycobacterium tuberculosis* reveals novel mutations associated with fluoroquinolone resistance [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2021, 58(3): 106385.

收稿日期: 2024-06-14