

# 非一线抗结核药物耐药机制及耐药性诊断研究进展

刘洋<sup>1,2</sup>, 王邦兴<sup>1</sup>, 刘志永<sup>1</sup>, 韩轶<sup>1</sup>, 谭耀驹<sup>3</sup>, 李昕洁<sup>3</sup>, 刘健雄<sup>3</sup>,  
谭守勇<sup>3</sup>, 张天宇<sup>1</sup>

1. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 呼吸疾病国家重点实验室, 广州 510530;
2. 安徽大学健康科学研究院, 合肥 230601;
3. 广州市胸科医院, 呼吸疾病国家重点实验室, 广州 510095

**摘要:** 结核病(Tuberculosis, TB)至今仍是世界三大传染疾病之一。2014 年, TB 导致的死亡人数已经超过 HIV。二线抗 TB 药物是临床治疗耐多药 TB(Multidrug-resistant TB, MDR-TB)的主要药物, 然而某些 MDR-TB 患者由于未及时诊断、治疗方案不合理、所处区域医疗条件差等原因, 逐渐发展成为广泛耐药 TB(Extensively drug-resistant TB, XDR-TB), 使治疗更加困难, 其死亡率甚至与肺癌接近。目前结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的耐药性机制研究已经转向非一线药物, 如二线、三线和一些新研发的抗 TB 药物, 揭示这些非一线药物的耐药机制对于耐药 TB 的治疗和新型抗 TB 药物的研发具有重要意义。本文对目前临床上使用的主要非一线药物的耐药机制研究进行了综述, 并对目前常用的 TB 耐药性诊断方法的优缺点进行了归纳比较。

**关键词:** 结核病; 结核分枝杆菌; 耐药; 诊断

## Progress in resistance mechanisms and diagnosis of non-first line anti-TB drugs

Yang Liu<sup>1,2</sup>, Bangxing Wang<sup>1</sup>, Zhiyong Liu<sup>1</sup>, Yi Han<sup>1</sup>, Yaoju Tan<sup>3</sup>, Xinjie Li<sup>3</sup>,  
Jianxiong Liu<sup>3</sup>, Shouyong Tan<sup>3</sup>, Tianyu Zhang<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health (GIBH), Chinese Academy of Sciences (CAS), Guangzhou 510530, China;
2. Institute of Health Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China;
3. Research Division on Tuberculosis, National Key Laboratory on Respiratory Diseases, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China

**Abstract:** Tuberculosis (TB) is one of the three major infectious diseases in China and all over the world. In 2014, for the first time, TB killed more people than HIV did. Non-first line anti-TB drugs are used as main drugs in the

收稿日期: 2016-04-20; 修回日期: 2016-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 81572037), 广州市科技计划项目(编号: 155700012, 201508020248)和呼吸疾病国家重点实验室的开放项目(编号: 2014SKLRD-006)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81572037), Guangzhou Municipal Clinical Medical Center Program (Nos. 155700012, 201508020248) and the Open Project Grant from the State Key Lab of Respiratory Disease (No. 2014SKLRD-006)]

作者简介: 刘洋, 本科, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 2015liuyang@ahu.edu.cn

通讯作者: 谭守勇, 硕士, 主任医师, 研究方向: 呼吸内科学。E-mail: tanshouyong@163.com

张天宇, 博士, 研究员, 研究方向: 药学和传染病学。E-mail: zhang\_tianyu@gibh.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-138

网络出版时间: 2016/8/8 15:12:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160808.1512.001.html>

treatment of MDR-TB. However, MDR-TB can gradually develop as extensively drug-resistant TB (XDR-TB) because of poor diagnosis, the unreasonable treatment, poor medical conditions and so on. The death rate of XDR-TB is close to lung cancer. Research on the mechanism of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* has turned to non first-line anti-TB drugs: second and third line drugs and some new anti-TB drugs in development. In this review, we summarized the drug resistance mechanisms of the common non-first line anti-TB drugs. Most of drug resistant TB patients can't get timely diagnosis and correct treatment. So at the end of this article, we also summarized the common methods to diagnose drug-resistant TB.

**Keywords:** tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; drug resistance; diagnosis

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的慢性传染病。世界卫生组织(WHO)2015年发布的统计数据表明,全球已确诊的活动性TB患者超过了2000万,2014年全世界TB新发病例增至960万,其中150万人死亡,死亡人数已超过HIV<sup>[1]</sup>(120万)。我国是全球22个TB流行较严重的国家之一,TB发病人数约占世界的13%<sup>[2]</sup>。

在敏感性TB的治疗过程中,由于抗TB药物的滥用、治疗方案不合理等多重因素,导致了耐药TB的出现。绝大多数耐药TB患者因为没有获得及时的诊断:全球只有19%的耐多药TB(Multidrug-resistant TB, MDR-TB)患者被诊断,而在中国仅有不到10%的MDR-TB患者被诊断。耐药TB患者盲目地接受治疗,造成治愈率低,全球MDR-TB患者中平均仅有一半左右治疗成功,并且治疗周期长,药物的毒副作用大,价格高。某些MDR-TB患者在错误的治疗过程中对非一线抗TB药物产生了耐药性,逐渐发展成为广泛耐药TB(Extensively drug-resistant TB, XDR-TB)<sup>[3]</sup>,而XDR-TB的死亡率甚至与肺癌接近<sup>[4]</sup>。有数据显示,MDR-TB和XDR-TB在临床中的比例不断上升,中国约有11万MDR-TB患者,8万XDR-TB患者,原发性耐药TB已经在部分地区爆发,逐渐成为耐药TB的主要来源<sup>[5]</sup>。更严峻的是,对所有的抗TB一线和二线药物都耐药的完全耐药TB(Totally drug-resistant TB, TDR-TB)也有报道。2007年意大利首次报道了TDR-TB病例,两位患者最终死亡<sup>[6]</sup>。随后TDR-TB在伊朗、印度等多个国家也相继被报道<sup>[7,8]</sup>。除了2012年底新获批的贝达喹啉(Bedaquiline, BQL)外,目前基本无有效

药物可以用于TDR-TB<sup>[3]</sup>的治疗。

揭示非一线药物的耐药机制可以为耐药TB的治疗和建立快速检测方法提供理论和方法上的指导,同时还有助于新型抗TB药物的研发。研究人员根据对非一线药物作用机制的研究,对这些药物进行改造,也可使其逐步发展成为一线临床药物。本文选取了目前临床上主要使用的非一线药物进行综述,旨在为从事TB临床检测、治疗、抗TB药物开发和TB耐药机制研究人员提供参考。

## 1 抗TB药物分类

目前对TB的治疗主要以药物治疗为主。依据治疗效率、药物种类以及使用经验,抗TB药物被分为5组类别<sup>[9]</sup>,详见表1。抗TB一线药物(第1组)是用于治疗敏感性TB的药物,主要包括乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)、吡嗪酰胺(Pyrazinamide, PZA)、异烟肼(Isoniazid, INH)和利福平(Rifampin, RIF)等。一线药物是目前临床治疗TB最常用和首选药物,其起效快、效果好、副作用低而且价格低。抗TB二线药物(第2、3、4组)的药效比一线药物要差,毒性和用量也较高,但其对一线药物不敏感的耐药TB有较好的疗效,所以临床上一般只用于治疗耐药TB。第5组药物最初并不是用于治疗TB,其对TB的药效作用目前并未得到充分验证,所以列为抗TB三线药物。在临床治疗上,目前对于一线药物敏感的TB,虽然治疗周期长,但已经可以被治愈。然而,非一线药物(二线、三线和一些新研发的抗TB药物)在临床上主要是用于耐药TB的治疗,因此临床医生一般将除INH、RIF、EMB和PZA这4种一线药以外的其他抗TB药物统称为非一线药物。

表 1 抗 TB 药物分类

Table 1 Classification of anti-TB drugs

组别	药物
第 1 组 一线口服药物	异烟肼(Isoniazid, INH)、利福平(Rifampicin, RIF)、乙胺丁醇(Ethambutol, EMB)、比嗪酰胺(Pyrazinamide, PZA)
第 2 组 二线注射药物	链霉素(Streptomycin, STM)、卡那霉素(Kanamycin, KAN)、阿米卡星(Amikacin, AMK)、卷曲霉素(Capreomycin, CPM)、硫酸紫霉素(Viomycin, VIM)
第 3 组 二线喹诺酮类口服药物	左氧氟沙星(Levofloxacin, LFX)、莫西沙星(Moxifloxacin, MFX)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CFX)、氧氟沙星(Ofloxacin, OFX)、加替沙星(Gatifloxacin, GFX)
第 4 组 二线口服药物	对氨基水杨酸(Para-Aminosalicylic Acid, PAS)、利奈唑胺(Linezolid, LZD)、乙硫异烟胺(Ethionamide, ETO)、丙硫异烟胺(Prothionamide, PTO)、环丝氨酸(Cycloserine, DCS)、氨硫脲(Thioacetazone, THZ)、特立齐酮(Terizidone, TRD)
第 5 组 三线药物	氯法齐明(Clofazimine, CFZ)、阿莫西林/克拉维酸(Amoxicillin plus Clavulanate, AMX/CLV)、克拉霉素(Clarithromycin, CLR)

## 2 主要非一线抗 TB 药物

### 2.1 喹诺酮类药物

喹诺酮类药物包括左氧氟沙星(Levofloxacin, LFX)、莫西沙星(Moxifloxacin, MFX)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CFX)和氧氟沙星(Ofloxacin, OFX)等, 主要作用于细菌的 II 型拓扑异构酶。细菌通常编码两种 II 型拓扑异构酶: DNA 解旋酶(DNA gyrase)和拓扑异构酶 IV (Topoisomerase IV)。Mtb 基因组只编码 DNA 解旋酶, 它是由 *gyrA* 编码的两个 A 亚基和 *gyrB* 编码的两个 B 亚基组成的一个四聚体<sup>[10]</sup>。喹诺酮类药物通过干扰解旋酶催化的反应而杀菌<sup>[11]</sup>, 药物结合到酶-DNA 二聚体上, 稳定共价结合的酶-酪氨酸-DNA 磷酸键, 形成的三聚体复合物能够阻止 DNA 复制, 导致细胞死亡<sup>[12]</sup>。喹诺酮类药物广泛用于耐药 TB 的治疗, 特别是对一线药物如 INH、RIF 不敏感的 MDR-TB 效果较好<sup>[13]</sup>, 甚至有人提出将这类药物晋升为一线抗 TB 药物。

喹诺酮类药物产生耐药主要与 *gyrA* 的第 74~113 位和 *gyrB* 的第 500~540 位核苷酸之间<sup>[14,15]</sup>的区域发生突变, 该区域也因此被称为喹诺酮类药物耐药决定区。

有数据表明, 在经济发达的国家(如美国)中, 其 MDR-TB 患者中对喹诺酮药物的耐药率为 4% 左右<sup>[16]</sup>。值得注意的是, 我国 MDR-MTB 病人对喹诺酮药物耐药比例远远高于发达国家。据调查, 山东地区

2004~2007 年 MDR-TB 中 72.6% 对非一线药物具有耐药性<sup>[17]</sup>。2005 年对河南 MDR-TB 患者的调查数据显示, 其对 OFX 的耐药率已经达到 48.1%<sup>[18]</sup>。潘雪琴等<sup>[19]</sup>对安徽胸科医院的临床样本分析发现, 约有 13.5% 的 MDR-TB 患者对 LFX 耐药。

### 2.2 主要注射类抗 TB 药物

临床主要使用的非一线注射类抗 TB 药物主要包括卡那霉素(Kanamycin, KAN)、链霉素(Streptomycin, STR)、卷曲霉素(Capreomycin, CAP)和阿米卡星(Amikacin, AMK)。除 CAP 为环多肽类药物外, 其他 3 种均属于氨基糖苷类药物。

1943 年美国加州大学伯克利分校的赛尔曼·A·瓦克斯曼从链霉菌(*Streptomyces*)中首次分离得到的 STR 是继青霉素后第二个生产并用于临床的抗生素, 他因此获得 1952 年诺贝尔生理学或医学奖<sup>[20]</sup>。STR 在一些国家被作为一线抗 TB 药物使用<sup>[21]</sup>。STR 主要是通过干扰甲酰甲硫氨酸 tRNA 和 30S 核糖体的结合, 抑制蛋白质合成, 最终导致 Mtb 死亡。不幸的是, STR 在仅仅投入临床使用几个月后就产生了耐药性。和 STR 耐药相关的基因有 *rpsL*<sup>[22]</sup>、*rrs*<sup>[22]</sup>和 *gidB*<sup>[10]</sup>, 临床上针对 STR 耐药的快速检测也是通过检测这 3 个基因的突变来判断。STR 耐药株的基因突变主要发生在 *rpsL* 的第 43 位和 88 位以及 *rrs* 的 530 和 912 环区, 而 *gidB* 的突变水平较低。最新的一个报道中显示 *rpsL* 的 43 位突变(K43R)和 STR 耐药有很高的相关性( $P < 0.01$ ), 而 *rrs* 和 *gidB* 的突变

和 STR 耐药的相关性较低( $P < 0.05$ )<sup>[23]</sup>。

CAP 对静止期的 Mtb 有效,且毒副作用比其他非一线抗 TB 药物小<sup>[24]</sup>。Maus 等报道 *tlyA* 和 *rrs* 突变会导致 Mtb 对 CAP 耐药,其中 *rrs* 突变点主要在 140(A1401G)和 148(G1484T)位<sup>[25]</sup>。然而我国研究人员报告在对 CAP 耐药的菌株中并没有 *tlyA* 突变<sup>[26]</sup>。CAP 的耐药率在抗 TB 药物中较低。潘雪琴等<sup>[17]</sup>报道其检测样本中 CAP 的耐药率仅为 2.4%。有报道表明在对北京胸科医院的样本分析中,CAP 的耐药率为 9.44%,而在这批样本中 STR 耐药率高达 45.11%<sup>[26]</sup>。

若患者对 STR 存在耐药,一般选用 KAN 或丁胺卡那霉素作为注射剂。这两种药物价格相对便宜,对于内耳结构性损伤程度也低于 STR,已在全球范围被广泛用于治疗耐药 TB。KAN、AMK 的耐药主要为获得性耐药。有数据表明,2009 年我国 KAN 的耐药率约为 10.5%<sup>[27]</sup>。虽然它们分属两类药物,且靶点也不同,但有报道指出这几种药物存在交叉耐药<sup>[28,29]</sup>,但它们之间具体交叉耐药程度还存在争议,目前认可度较高的观点是 STR 与其他 3 种药物存在较低的交叉耐药,KAN 和 AMK 之间为完全交叉耐药。

### 2.3 乙硫异烟胺(Ethionamide, ETO)和丙硫异烟胺(Prothionamide, PTO)

ETO 和 PTO 的销售价格较低、治疗效果明显,所以临床上使用这两种药物较多。它们是前体药,需要在 Mtb 胞内通过代谢转化成活性物质。进入体内后,首先由单加氧酶激活,该酶的编码基因为 *ethA*,该基因突变会导致 Mtb 耐药<sup>[30]</sup>。同时也有文献指出,*ndh* 基因突变会导致其编码的型 NADH 脱氢酶受到影响,无法提供充足的  $\text{NAD}^+$ ,也会对 ETO 和 PTO 产生耐药<sup>[31]</sup>。有数据表明,这些药物与 INH 有部分交叉耐药<sup>[32]</sup>,然而目前关于这两种药物的具体耐药机制还没有完全统一的定论<sup>[33,34]</sup>。

### 2.4 环丝氨酸(Cycloserine, DCS)

DCS 具有广谱抗菌作用,对多数革兰氏阳性及阴性菌具有较弱抑制作用。DCS 是丙氨酸的类似物,其可以通过抑制 Mtb 的丙氨酸消旋酶,导致 Mtb 无法产生充足的 D 型丙氨酸来合成用于组成细胞壁的五肽。研究表明,在耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium*

*smegmatis*)中过表达丙氨酸消旋酶和连接酶,会产生 DCS 的抗性,但是丙氨酸消旋酶产生的耐药程度要高于丙氨酸连接酶<sup>[35,36]</sup>。此外,BCG(*Bacillus Calmette-Guérin*)的丝氨酸的运输载体的突变会导致 BCG 对 DCS 的耐药<sup>[37,38]</sup>。

### 2.5 对氨基水杨酸(Para-amino salicylic acid, PAS)

PAS 可以竞争性抑制对氨基苯甲酸,阻碍 Mtb 的叶酸合成,对 TB 患者的疗效较好,然而其副作用较大,会引起一系列皮肤不适,如皮疹、红斑等,尤其是其乙酰化后,对于肠胃有较高的毒性。目前在临床上对于 PAS 耐药的比例却相对较小,所以 PAS 经常被选择作为主要的非一线药物来治疗感染 MDR 菌株的患者<sup>[39]</sup>。*thyA* 编码的胸腺嘧啶核苷酸合酶,可以使 dUMP 去甲基化,转变为 dTMP<sup>[40]</sup>。在 PAS 耐药的 Mtb 中,37%存在 *thyA* 基因突变,然而仍有很大一部分耐药 Mtb 并没有发生 *thyA* 基因突变,说明 PAS 除了 *thyA* 基因突变外,还存在其他的耐药机制。PAS 是抑菌药,它能够很大程度的增强其他药物的杀菌活性和降低其他药物耐药性的产生,所以临床上一般是将它与其他药物联合使用。

### 2.6 利奈唑胺(Linezolid, LZD)

近年来第一个上市的恶唑烷酮类药物 LZD,在小鼠模型和人体试验中均表现出良好的治疗耐药 TB 的活性<sup>[41]</sup>。尽管价格昂贵而且毒性较强,仍有一定数量的患者在使用 LZD 进行治疗。LZD 抗 Mtb 的作用机制主要是通过 Mtb 的核糖体 50S 亚基结合,抑制 mRNA 与核糖体连接,阻止 70S 起始复合物的形成,从而在翻译的早期阶段抑制 Mtb 蛋白质合成。LZD 联合其他药物治疗 MDR-TB 的治愈率较高<sup>[42,43]</sup>,然而其耐药机制一直不甚清楚。最近本实验室的研究结果证实 *rplC*(T460C)基因编码的核糖体蛋白 L3 的第 154 位氨基酸突变(Cys154Arg)可以导致 Mtb 对恶唑烷酮类药物(包括 LZD 和新研发的 PNU)耐药。*rplC*(T460C)基因突变可作为诊断临床 Mtb 对该类药物耐药的分子诊断标记<sup>[44]</sup>。

### 2.7 BQL

强生公司的新药 BQL,又称 TMC207,属于二芳基喹啉类药物,是美国食品药品监督管理局(FDA)近 40 年来首次批准的针对 TB 的药物。该药物存在严



重的不良反应：肝毒性、QT 时间延长、潜在的严重的心律失常和细胞磷脂蓄积，而且 BQL 的半衰期较长，造成这些不良反应会持续至停药后。在一项随机对照研究中，服用 BQL 的死亡率甚至高于服用安慰剂组<sup>[45]</sup>。FDA 在用药指导上特别指出，只有在多数药物治疗 TB 无效的情况下方能使用。值得一提的是，该药仅仅通过一期临床就被批准用于临床，说明世界急需新型抗 Mtb 药物。BQL 是通过抑制 Mtb 的 ATP 合成酶 F<sub>0</sub> 的 C 亚基(AtpE)从而抑制 ATP 合成来发挥作用<sup>[46]</sup>。但是由于在有些耐 BQL 的 Mtb 突变株中并未发现 *atpE* 发生突变，所以 BQL 肯定还存在其他的作用机制。BQL 具有分枝杆菌特异性，对其他细菌基本无效。已有研究证实，BQL 对于潜伏状态的 Mtb 具有很好的杀灭作用<sup>[47]</sup>。在潜伏/休眠状态下的 Mtb 中因 ATP 存储不足 极易被 BQL 消耗<sup>[48]</sup>。

## 2.8 氯法齐明(Clofazimine, CLF)

CLF 具有抗麻风分枝杆菌和鸟型分枝杆菌的作用，最初用于治疗麻风病。20 世纪末开始试用于 MDR-TB 的治疗，其对 Mtb 的体外最低抑菌浓度范围仅 0.01~5 mg/L<sup>[49]</sup>。现已证实其对 MDR-TB 具有很高的敏感性，并且产生耐药的比例较低<sup>[50,51]</sup>，但其作用机制目前仍然未能完全阐明<sup>[52]</sup>。然而，已有研究表明编码外排泵 *MmpL5* 基因的调节基因 *Rv0678* 的突变会导致外排泵 *MmpL5* 基因过表达，从而产生了对 CLF 和 BQL 的交叉耐药<sup>[53]</sup>。有研究人员对 96 株临床耐药菌株进行测序分析，发现 2 个新的基因 *Rv1979c* 和 *Rv2535c* 的突变可能与 CLF 耐药相关<sup>[54]</sup>。

## 3 主要非一线抗 TB 药物的作用机制小结

目前不少非一线药物的作用机制已基本被阐明，我们将其分为 7 组，详见表 2。第 1 和第 2 组药物虽然都是抑制蛋白质合成过程，但它们作用的靶点却不同。第 1 组药物的靶点是 30 S 核糖体，包括 KAN、AMK、CPM、STM，而第 2 组则是靶向 50 S 核糖体。第 3 组和第 4 组药物分别抑制分枝菌和肽聚糖的合成，这两种物质都和 Mtb 的细胞壁有关，所以也有人将这两组药物归纳在一起。第 5 组为抑制细菌旋转酶和拓扑异构酶 IV 的喹诺酮类药物，不同的喹诺酮药物因其修饰的基团不一样，作用途经也有一定的差异，但都和 DNA 复制有关。第 6 组和第 7 组分别是抑制叶酸和铁的代谢的 PAS 和抑制线粒体 ATP 合酶的 BQL。我们可以看出，虽然非一线抗 TB 药物数量较多，但它们很多的作用机制都是类似的，这就造成了很多药物存在交叉耐药，这也是目前耐药 TB 治疗困难的原因之一。在过去十几年中，尽管有一些抗 TB 化合物被发现(至少 10 种已进入临床实验)，但目前只有 2~3 类具有新机制抗 TB 药。药物是抗击 TB 的主角，我们需要加大新机制药物开发的力度。

## 4 主要非一线抗 TB 药物的耐药机制小结

### 4.1 耐药相关基因突变

抗 TB 药物的耐药机制研究中，基因突变介导的耐药研究报告最多。最初研究人员发现药物作用靶点的编码基因，如编码 DNA 旋转酶的 *gyrA* 和 *gyrB*、编码 16S rRNA 的 *rrs*、编码 NADH 烯酰基载体蛋白

表 2 主要非一线抗 TB 药物的作用机制

Table 2 Mechanisms action of non-first anti-TB drugs

组别	药物	作用机制	参考文献
第 1 组	KAN, AMK, CPM, STM	抑制蛋白质合成(30 S 核糖体)	[21, 29]
第 2 组	LZD, CLR	抑制蛋白质合成(50 S 核糖体)	[40]
第 3 组	ETO, THZ(抑制合成中的甲基转移酶)	抑制分枝菌的合成	[30]
第 4 组	DCS	抑制肽聚糖的合成	[35]
第 5 组	LFX, MFX, CFX, OFX 等喹诺酮类药物	抑制细菌、旋转酶和拓扑异构酶 IV	[15]
第 6 组	PAS	抑制叶酸和铁的代谢	[39]
第 7 组	BQL	抑制线粒体 ATP 合酶	[47]

还原酶的 *inhA*<sup>[55]</sup>等, 这些基因突变会导致耐药。但后来发现很多临床耐药菌株并不存在这些突变, 这就很难仅根据特定靶基因的突变来判断临床菌株是否真的耐药。随着研究的深入, 人们发现一些基因编码的并不是药物作用靶标, 如编码多谷氨酰胺叶酸合成酶的 *folC*<sup>[56]</sup>、编码胞苷酸合成酶的 *thyA*<sup>[57]</sup>等, 但它们也可以使 Mtb 产生耐药, 这就拓展了耐药相关基因的范围。如果可以找到和抗 TB 药物耐药对应的一系列突变的基因, 根据这些对应关系, 可以针对性地开发相应的临床耐药 TB 快速诊断方法, 给临床诊断提供指导, 进一步提高治疗的精准性, 这对于耐药 TB 的控制有重要意义。这些相关基因还可以帮助更深层次地了解药物的作用机制和开发治疗耐药 TB 的新药。目前已经有不少文献报告与非一线药物耐药相关的基因, 详见表 3。

4.2 药物外排泵表达

近年来, 随着表观遗传学等学科和测序手段的进步, 越来越多的研究人员开始直接从基因表达水平了解 Mtb 的耐药。在体外对 Mtb 施加药物时, 发现耐药菌株在基因表达水平存在明显变化, 这其中研究较多的就是外排泵相关的基因表达增高所导致的耐药<sup>[58]</sup>。当对 TB 患者进行药物治疗时, 抗 TB 药

物对体内的 Mtb 施加压力, Mtb 的外排泵相关的基因表达逐渐升高, 将扩散至菌内的药物以更快的速度运输出去, 药物无法充分到达靶位发挥作用, 最后产生了耐药的表型<sup>[59]</sup>。在体外添加外排泵抑制剂后, 药物的体外最低抑菌浓度有一定的降低<sup>[58]</sup>。已有数据显示, 外排泵基因过表达, 会产生交叉耐药<sup>[52]</sup>, 然而并不能排除有的药物有独特的外排泵, 这些都还未得到充分验证。

4.3 细胞壁变化和抑制药物的酶

已有研究结果证明, 细胞壁交联度和厚度增加会导致 Mtb 耐药, 研究人员猜测这有可能会致药物无法进入细菌胞内而到达作用靶位发挥抗菌效力, 导致对药物产生抗性<sup>[60]</sup>。在无氧、酸性、饥饿等生长条件下, 非复制状态的 Mtb 在整个菌群中的比例会随着培养时间增加而上升<sup>[61]</sup>, 而这种状态下的 Mtb 的细胞壁交联度和厚度都会增加, 并且一些与编码细胞壁结构相关的小热休克蛋白的基因表达增高<sup>[62]</sup>。还有报道显示 Mtb 在药物作用下, 会产生抑制药物作用的酶或其他物质。如 Mtb 产生的谷氨酸消旋酶(*Mur* )可以干扰喹诺酮类药物发挥活性<sup>[63]</sup>。

Mtb 的这些特殊状态是在药物或机体免疫作用下的一种适应性表现, 这种状态变化能否引起基因

表 3 主要非一线药物耐药相关的基因  
Table 3 The genes related to resistance to non-first anti-TB drugs

基因	基因编码的物质/功能	相关药物	参考文献
<i>gyrA</i> 和 <i>gyrB</i>	DNA 旋转酶	喹诺酮类药物	[13]
<i>rrs</i>	16S rRNA	KAN、AMK、CAP、LZD	[22]
<i>tlyA</i>	rRNA 甲基转移酶	CAP	[56]
<i>eis</i>	氨基糖苷乙酰转移酶	KAN	[28]
<i>inhA</i>	NADH 烯酰基载体蛋白还原酶	ETO	[54]
<i>eth</i>	转录阻遏蛋白	ETO	[30]
<i>ndh</i>	型 NADH 脱氢酶	ETO	[31]
<i>gidB</i>	甲基转移酶	STR	[10]
<i>rpsL</i>	核糖体 30S 亚单位 S12 蛋白	STR	[53]
<i>folC</i>	多谷氨酰胺叶酸合成酶	PAS	[55]
<i>dfrA</i>	二氢叶酸还原酶	PAS	[55]
<i>thyA</i>	胞苷酸合成酶	PAS	[56]
<i>rplC</i>	核糖体蛋白	LZD	[43]
<i>atpE</i>	ATP 合成酶 F0 的 C 亚基	BQL	[45]
<i>Rv0678</i>	调节外排泵 MmpL5 的表达	CLF	[49]

层面的突变,而稳定遗传给下一代,还未得到充分验证。本实验室最近发表了一篇基本概括了所有抗 TB 药物和新抗 TB 化合物耐药机理研究进展的文章<sup>[64]</sup>,感兴趣的读者可以参考。值得一提的是,传统的药物往往只针对正常状态的 Mtb,对这些特殊状态的 Mtb 作用有限,这也是目前 TB 治疗周期长的原因之一。本实验室依托自主开发的无抗性标记的自主发光 Mtb,正在构建针对于这些特殊状态的 Mtb 的药物发现模型。

## 5 对非一线抗 TB 药物的耐药性检测

### 5.1 表型(Phenotype)诊断

传统的比例法<sup>[65]</sup>是前 WHO 的 TB 研究领域的主席 Jacques Grosset 等人提出的,现在被认为是抗 TB 药物药敏检测的金标准,但其所需的检测时间过长,不利于早期的诊断治疗,延误病情。随后兴起的 BACTEC MGIT 960 系统<sup>[66]</sup>是一种快速培养系统,通过连续检测接种标本的培养管所显示的荧光强度的变化来判断是否有分枝杆菌生长。管中的荧光显示剂将随着管内氧气浓度的变化而发生反应,可快速检测 Mtb,9~12 d 即可获得药敏结果。与固体培养基药敏检测相比,其对于一线、非一线抗 TB 药

物的敏感性检测有较高的特异性和敏感性<sup>[67]</sup>。该系统现已普遍应用于临床,但其所需费用较高。

近些年出现了很多快速的表型检测方法,如显微镜观察药物敏感性试验技术<sup>[68]</sup>(Microscopic observation drug susceptibility),其通过使用倒置显微镜来观察培养基中 Mtb 的特征结构,来辨别其是否生长,进而推测出其敏感性<sup>[69]</sup>。还有刃天青微孔板稀释法<sup>[70]</sup>、荧光素酶报告噬菌体(LRP)检测法<sup>[71]</sup>、生物发光法(检测活菌中的 ATP 含量)<sup>[72]</sup>等,这些方法目前主要还是在实验室阶段使用,临床使用还有待检验,对非一线药物耐药性检测的适用性有待进一步检测,详见表 4。

### 5.2 分子诊断技术

DNA 基因测序,是通过 PCR 技术将耐药相关的基因片段扩增测序,将检测结果和标准的野生菌株同位置的片段对比,直接检测出突变的位置和突变类型<sup>[73,74]</sup>。该方法目前应用最广泛,也是接受度最高,最可靠的分子诊断方法。然而一代测序方法效率低且错误较多,样品易污染,操作要求高,限制了其临床推广和应用。随着二代测序技术<sup>[75]</sup>的出现,这些问题在一定程度上的得到了解决,而且二代测序可以通过全基因组的对比分析,区分获得性

表 4 通过表型检测 Mtb 对抗 TB 药物敏感性的方法的比较<sup>[a]</sup>

Table 4 Comparison of phenotypic detection methods for anti TB drug resistance

检测方法	优点	缺点	对非一线药物的适用性
比例法	接受度高,可准确计算对药物耐药的 Mtb 的比例,是检测的“金标准”	比较耗时,也不利于早期的诊断治疗,延误病情	目前主要的非一线抗 TB 药物都是以此方法为检测标准
BACTEC MGIT960 系统	检测快速,9~12 d 即可获得药敏结果。	所需费用很高	对主要的非一线抗 TB 药物的敏感性检测有不错的特异性和敏感性
显微镜观察药物敏感性试验技术	检测速度快,成本很低	操作繁琐,需要人为观察,主观性较大	对 STR、INH、RIF、EMB、LFX、AMK 和 CAP)药物的检测结果与传统的比例法相当
刃天青微孔板稀释法	可以便捷的高通量的测量,对二线药物有不错的特异性和敏感度	操作流程很多细节还需要统一,比较耗时	对 ETO、KAN、CAP、OFX 和 PAS 5 种药物的耐药性检测的特异性均为 100%,敏感度在 96%以上
生物发光法(检测活菌中的 ATP 含量)	快速(3-7 天内可获得药敏结果且可重复性好)	ATP 提取繁琐,检测昂贵	对一线药物的敏感度和特异性在 95%左右,非一线药物有待检验
荧光素酶报告噬菌体(LRP)检测法	简便、快捷特异检测活菌	培养基易污染。荧光素昂贵,且穿透细胞壁能力较差。ATP 水平与活菌数相关性不高。	和传统比例法相比,对喹诺酮类药物符合率较差,阿米卡星符合率在 90%左右

注:a. 表型检测是针对通过基因型(Genotype)判断而言。表型检测所得到的结果体现的是菌在含有药物的培养基的生长情况,所以判断出的耐药是真实的耐药。而基因型检测是通过基因序列进行检测,不能 100%保证表型一定敏感或耐药。

表 5 检测抗 TB 药物耐药性的 DNA 分子诊断技术比较

Table 5 Comparison of molecular diagnostic techniques for anti-TB drug resistance

检测方法	优点	缺点
传统基因测序	快速直接, 测序后和标准的野生菌株对比, 直接读出突变的位置和突变类型	成本较高, 操作要求高, 易污染产生假阳性, 限制了其临床推广和应用
二代基因测序	准确率提高, 成本显著降低, 可以从全基因组水平分析	数据分析复杂、Mtb 的中重复基因仍需进行传统方法的测序
DNA 芯片	简便、快速、敏感, 适用于临床批量 Mtb 菌株耐药性初筛	需提前通过 PCR 准备目标基因片段, 实验操作繁琐
PCR 单链构象多态性分析	与测序技术相比, 该方法操作简单、快速、敏感、特异, 已经广泛使用	容易受检测样本和检测过程的条件的影响, 并且不能给出突变的具体位置和突变性质
GenXpert	较灵敏, 操作方便, 同时可较快速诊断是否对 RIF 耐药	设备非常昂贵, 对工作人员要求较高, 不能区分细菌是存活还是死亡, 主要检测一线药物 RIF 的敏感性
GenoType MTBDRsl 分子线性探针技术	检测周期只有短短几天时间, 无需购置贵重设备, 操作便捷	检测非一线药物敏感性还处于临床评估阶段

耐药和原发性耐药<sup>[76]</sup>, 仅依靠传统分子流行病学方法和药敏试验很难实现这一点。还有一些其他的基于 DNA 扩增的检测技术, 如 PCR 单链构象多态性分析<sup>[77]</sup>、GenXpert<sup>[78]</sup>等, 这些方法目前主要还是用于一线抗 TB 药物, 而对非一线抗 TB 药物还有待开发。

新近开发的针对检测非一线药物的 GenoType MTBDRsl 分子线性探针技术<sup>[79]</sup>, 主要是通过检测药物耐药的相关基因突变来甄别是否耐药, 如: 和氟喹诺酮类药物的耐药性相关的 *gyrA* 基因突变, 检测 16S rRNA 基因(*rrs*)突变确定对氨基糖苷类/环肽类药物的耐药性。其也用于检测 *embB* 基因突变确定对 EMB 的耐药性<sup>[80]</sup>。由于之前绝大多数试验室都只做一线药物的药敏测试, 因此, 针对非一线药物的分子学检测方法不多。我们将这些方法的优缺点进行了简要比较, 详见表 5。

## 6 结 语

非一线抗 TB 药物耐药机制中研究最多的是突变耐药机制, 发现耐药的相关基因, 可以帮助建立检测耐药性的 DNA 分子诊断技术和开发具有新机制的药物。分子诊断技术比传统的表型诊断技术更快速安全, 而快速精准地判断出 Mtb 的耐药性, 是控制 TB 耐药的关键。非一线抗 TB 药物中很多药物的作用机制相同, 这就导致了交叉耐药的出现, 开发新机制的药物是耐药 TB 治疗的基础。

随着对 Mtb 耐药机制的研究不断深入, 突变耐药机制已经不能完全解释 Mtb 耐药, 一些其他的耐药机制也越来越受到研究人员的重视, 如: 外排泵基因表达变化、产生抑制药物作用的酶和细胞壁交联度改变等。目前敏感型 TB 的治疗周期需要 6 个月, 耐药 TB 的治疗周期更长, 更全面地了解 TB 耐药机制, 可以为研发可缩短治疗周期的药物和疗法提供有价值的线索。

我国 MDR-TB 患者中对于非一线药物耐药比例远远高于发达国家, 耐药情况十分严峻。同时, 随着我国经济的不断发展, 人口流动的不断加剧, 存在大量的封闭场所和设施, 需要警惕传播性 MDR-TB 的爆发。我国作为 TB 重灾区, 急需加强对现有抗 TB 药物的作用机制进行深入研究, 加大新型抗 TB 药物研发的投入, 从长远角度控制耐药 TB。

## 参考文献(References):

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Geneva: World Health Organization, 2015. [DOI]

[2] Technical Guidance Group of the Fifth National TB Epidemiological Survey, the Office of the Fifth National TB Epidemiological Survey. The fifth national tuberculosis epidemiological survey in 2010. *Chin J Antituberc*, 2012, 34(8): 485-508.

全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告. 中国防痨杂志,



- 2012, 34(8): 485–508. [DOI]
- [3] Van Rie A, Enarson D. XDR tuberculosis: an indicator of public-health negligence. *Lancet*, 2006, 368(9547): 1554–1556. [DOI]
- [4] Iseman MD. Evolution of drug-resistant tuberculosis: A tale of two species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(7): 2428–2429. [DOI]
- [5] Zhao YL, Xu SF, Wang LX, Chin DP, Wang SF, Jiang GL, Xia H, Zhou Y, Li Q, Ou XC, Pang Y, Song YY, Zhao B, Zhang HT, He GX, Guo J, Wang Y. National survey of drug-resistant tuberculosis in China. *N Engl J Med*, 2012, 366(23): 2161–2170. [DOI]
- [6] Migliori GB, De Iaco G, Besozzi G, Centis R, Cirillo DM. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill*, 2007, 12(5): E070517. [DOI]
- [7] Klopper M, Warren RM, Hayes C, van Pittius NCG, Streicher EM, Müller B, Sirgel FA, Chabula-Nxiweni M, Hoosain E, Coetzee G, van Helden PD, Victor TC, Trollip AP. Emergence and spread of extensively and totally drug-resistant tuberculosis, South Africa. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(3): 449–455. [DOI]
- [8] Udawadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, Rodrigues C. Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(4): 579–581. [DOI]
- [9] ZumLa A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(5): 388–404. [DOI]
- [10] Wong SY, Lee JS, Kwak HK, Via LE, Boshoff HIM, Barry CE. Mutations in *gidB* confer low-level streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(6): 2515–2522. [DOI]
- [11] Gao Q, Huang HH. Update on antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(5): 458–464.  
高琼, 黄海辉. 艰难梭菌耐药性及耐药机制研究进展. *遗传*, 2015, 37(5): 458–464. [DOI]
- [12] Long QX, He Y, Xie JP. The molecular physiological and genetic mechanisms underlying the superb efficacy of quinolones. *Acta Pharm Sin*, 2012, 47(8): 969–977.  
龙泉鑫, 何颖, 谢建平. 喹诺酮类药物作用的生理和遗传的分子机制. *药学报*, 2012, 47(8): 969–977. [DOI]
- [13] Zhang S, Chen JZ, Cui P, Shi WL, Zhang WH, Zhang Y. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(9): 2507–2510. [DOI]
- [14] Pantel A, Petrella S, Veziris N, Brossier F, Bastian S, Jarlier V, Mayer C, Aubry A. Extending the definition of the *GyrB* quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(4): 1990–1996. [DOI]
- [15] Berning SE. The role of fluoroquinolones in tuberculosis today. *Drugs*, 2001, 61(1): 9–18. [DOI]
- [16] Bozeman L, Burman W, Metchock B, Welch L, Weiner M, Consortium TT. Fluoroquinolone susceptibility among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the United States and Canada. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(3): 386–391. [DOI]
- [17] Wang HY, Wang Y, Yu CB, Zuo Y, Wang JL, Liu ZM. Study of the status of drug resistant tuberculosis in 12 counties in Shandong. *Prev Med Trib*, 2008, 14(12): 1075–1076, 1080.  
王海英, 王燕, 于春宝, 左云, 王俊玲, 刘志敏. 2004~2007 年山东省部分结核分枝杆菌耐药情况检测分析. *预防医学论坛*, 2008, 14(12): 1075–1076, 1080. [DOI]
- [18] Zhang GL, Du CM, Takuya K, Wang W, Shi RR. China-Japan cooperation project on second line tuberculosis drug resistance survey in Henan Province. *J Med Forum*, 2005, 26(19): 14–16.  
张国龙, 杜长梅, 苍泽卓也, 池田雄史, 王伟, 石瑞如. 中日合作对河南省结核菌二线药物耐药监测研究. *医药论坛杂志*, 2005, 26(19): 14–16. [DOI]
- [19] Pan XQ, Xu DF, Wang DP, Chai H, Yu SQ, Wang Q. Drug resistance of 251 strains of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* to second-line drugs. *Anhui Med Pharm J*, 2012, 16(9): 1339–1340.  
潘学琴, 徐东方, 王东萍, 柴华, 於淑琦, 王庆. 251 株耐多药结核分枝杆菌二线药耐药结果分析. *安徽医药*, 2012, 16(9): 1339–1340. [DOI]
- [20] Schatz A, Bugle E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Exp Biol Med*, 1944, 55(1): 66–69. [DOI]
- [21] Cuevas-Córdoba B, Cuellar-Sánchez A, Pasissi-Crivelli A, Santana-Álvarez CA, Hernández-Illezcas J, Zenteno-Cuevas R. *rrs* and *rpsL* mutations in streptomycin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Mexico. *J Microbiol Immunol Infect*, 2013, 46(1): 30–34. [DOI]
- [22] Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Williams DL, Kreiswirth BN, Musser JM. Characterization of *rpsL* and *rrs* mutations in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse geographic localities. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(4): 1024–1026. [DOI]
- [23] Smittipat N, Juthayothin T, Billamas P, Jaitrong S, Rukseeree K, Dokladda K, Chaiyasirinroje B, Disrathakit A, Chaiprasert A, Mahasirimongkol S, Yanai H, Yamada N, Tokunaga K, Palittapongarnpim P. Mutations in *rrs*, *rpsL* and *gidB* in streptomycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Thailand. *J Glob Antimicrob Res*,

- 2016, 4: 5–10. [DOI]
- [24] Heifets L, Simon J, Pham V. Capreomycin is active against non-replicating *M. tuberculosis*. *Ann Clin Microb Anti*, 2005, 4(1): 6. [DOI]
- [25] Maus CE, Plikaytis BB, Shinnick TM. Molecular analysis of cross-resistance to capreomycin, kanamycin, amikacin, and viomycin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(8): 3192–3197. [DOI]
- [26] Du QL, Dai GM, Long QX, Yu X, Dong LL, Huang HR, Xie JP. *Mycobacterium tuberculosis* rrs A1401G mutation correlates with high-level resistance to kanamycin, amikacin, and capreomycin in clinical isolates from mainland China. *Diagnost Microbiol Infect Dis*, 2013, 77(2): 138–142. [DOI]
- [27] Chang S, Fu YH, Li Q, Bu JL, Huang HR, Ma Y, Chen XY. Analysis on drug resistance and cross resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical samples to four injectable antituberculous drugs. *Chin J Antituberc*, 2013, 35(1): 37–40  
常珊, 付育红, 李琦, 卜建玲, 黄海荣, 马珂, 陈效友. 结核分枝杆菌临床分离株对四种注射用抗结核药物耐药及交叉耐药分析. 中国防痨杂志, 2013, 35(1): 37–40. [DOI]
- [28] Wang L, Shi XD. Activity of four amino glycosides antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Exp Lab Med*, 2009, 27(4): 367–368.  
王雷, 施旭东. 4 种氨基糖苷类抗生素对结核分枝杆菌 (MTB) 的体外抑菌作用的研究. 实验与检验医学, 2009, 27(4): 367–368. [DOI]
- [29] Jugheli L, Bzekalava N, de Rijk P, Fissette K, Portaels F, Rigouts L. High level of cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the rrs gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(12): 5064–5068. [DOI]
- [30] Via LE, Cho SN, Hwang S, Bang H, Park SK, Kang HS, Jeon D, Min SY, Oh T, Kim Y, Rajan V, Wong SY, Shampata IC, Carroll M, Goldfeder L, Lee SA, Holland SM, Eum S, Lee H, Barry CE III. Polymorphisms associated with resistance and cross-resistance to aminoglycosides and capreomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from South Korean Patients with drug-resistant tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2): 402–411. [DOI]
- [31] Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs W Jr. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 1994, 263(5144): 227–230. [DOI]
- [32] Vilch  ze C, Weisbrod TR, Chen B, Kremer L, Hazb  n MH, Wang F, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. Altered NADH/NAD<sup>+</sup> ratio mediates coresistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(2): 708–720. [DOI]
- [33] De Kantor IN, Barrera L. Susceptibility tests to second line drugs and re-treatment of tuberculosis. Revisiting early experiences. *Medicina*, 2007, 67(3): 231–237. [DOI]
- [34] Vilch  ze C, Wang F, Arai M, Hazb  n MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1027–1029. [DOI]
- [35] Larsen MH, Vilch  ze C, Kremer L, Besra GS, Parsons L, Salfinger M, Heifets L, Hazb  n MH, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2002, 46(2): 453–466. [DOI]
- [36] C  ceres NE, Harris NB, Wellehan JF, Feng Z, Kapur V, Barletta RG. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 1997, 179(16): 5046–5055. [DOI]
- [37] Feng ZY, Barletta RG. Roles of *Mycobacterium smegmatis* D-alanine: D-alanine ligase and D-alanine racemase in the mechanisms of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-cycloserine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(1): 283–291. [DOI]
- [38] Chen JM, Uplekar S, Gordon SV, Cole ST. A point mutation in *cycA* partially contributes to the D-cycloserine resistance trait of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43467. [DOI]
- [39] Mitnick C, Bayona J, Palacios E, Shin S, Furin J, Alc  ntara F, S  nchez E, Sarria M, Becerra M, Fawzi MCS, Kapiga S, Neuberg D, Maguire JH, Kim JY, Farmer P. Community-based therapy for multidrug-resistant tuberculosis in Lima, Peru. *N Engl J Med*, 2003, 348(2): 119–128. [DOI]
- [40] Mathys V, Wintjens R, Lefevre P, Bertout J, Singhal A, Kiass M, Kurepina N, Wang XM, Mathema B, Baulard A, Kreiswirth BN, Bifani P. Molecular genetics of *para*-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 2100–2109. [DOI]
- [41] Sotgiu G, Pontali E, Migliori GB. Linezolid to treat MDR-/XDR-tuberculosis: available evidence and future scenarios. *Eur Respir J*, 2015, 45(1): 25–29. [DOI]
- [42] Curtin   C, De Angelis M, Cipriani M, Corbo M, McSweeney PLH, Gobetti M. Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. *J Appl Microbiol*, 2001, 91(2): 312–

321. [DOI]
- [43] Koh WJ, Kwon OJ, Gwak H, Chung JW, Cho SN, Kim WS, Shim TS. Daily 300 mg dose of linezolid for the treatment of intractable multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(2): 388–391. [DOI]
- [44] Makafe GG, Cao YY, Tan YJ, Julius M, Liu ZY, Wang CW, Njire MM, Cai XS, Liu TZ, Wang BX, Pang W, Tan SY, Zhang BC, Yew WW, Lamichhane G, Guo JT, Zhang TY. Oxazolidinone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: what is the role of Cys154Arg mutation in the ribosomal protein L3? *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, doi: 10.1128/AAC.00152-16. [DOI]
- [45] Diacon AH, Pym A, Grobusch MP, de los Rios JM, Gotuzzo E, Vasilyeva I, Leimane V, Andries K, Bakare N, De Marez T, Haxaire-Theeuwes M, Lounis N, Meyvisch P, De Paepe E, van Heeswijk RPG, Dannemann B. Multi-drug-resistant tuberculosis and culture conversion with bedaquiline. *N Engl J Med*, 2014, 371(8): 723–732. [DOI]
- [46] Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Göhlmann HWH, Neefs JM, Winkler H, Van Gestel J, Timmerman P, Zhu M, Lee E, Williams P, De Chaffoy D, Huitric E, Hoffner S, Cambau E, Truffot-Pernot C, Lounis N, Jarlier V. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2005, 307(5707): 223–227. [DOI]
- [47] Zhang T, Li S Y, Williams K N, Williams, K. N., Andries, K., & Nuermberger, E. L. Short-course chemotherapy with TMC207 and rifapentine in a murine model of latent tuberculosis infection. *Am J Resp Crit Care*, 2011, 184(6): 732–737. [DOI]
- [48] Koul A, Vranckx L, Dendouga N, Balemans W, Van Den Wyngaert I, Vergauwen K, Göhlmann HWH, Willebrords R, Poncelet A, Guillemont J, Bald D, Andries K. Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis. *J Biol Chem*, 2008, 283(37): 25273–25280. [DOI]
- [49] Mothiba MT, Anderson R, Fourie B, Germishuizen WA, Cholo MC. Effects of clofazimine on planktonic and bio-film growth of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *J Glob Antimicrob Re*, 2015, 3(1): 13–18. [DOI]
- [50] Field SK, Cowie RL. Treatment of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex lung disease with a macrolide, ethambutol, and clofazimine. *Chest*, 2003, 124(4): 1482–1486. [DOI]
- [51] du Toit LC, Pillay V, Danckwerts MP. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respir Res*, 2006, 7(1): 118. [DOI]
- [52] Mukherjee JS, Rich ML, Socci AR, Joseph JK, Virú FA, Shin SS, Furin JJ, Becerra MC, Barry DJ, Kim JY, Bayona J, Farmer P, Fawzi MCS, Seung KJ. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet*, 2004, 363(9407): 474–481. [DOI]
- [53] Cholo MC, Steel HC, Fourie PB, Germishuizen WA, Anderson R. Clofazimine: current status and future prospects. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(2): 290–298. [DOI]
- [54] Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole ST. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(5): 2979–2981. [DOI]
- [55] Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JDA. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis*, 1996, 173(1): 196–202. [DOI]
- [56] Zhao F, Wang XD, Erber LN, Luo M, Guo AZ, Yang SS, Gu J, Turman BJ, Gao YR, Li DF, Cui ZQ, Zhang ZP, Bi LJ, Baughn AD, Zhang XE, Deng JY. Binding pocket alterations in dihydrofolate synthase confer resistance to para-aminosalicylic acid in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(3): 1479–1487. [DOI]
- [57] Parish T, Stoker NG. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* *tlyA plcABC* mutant by gene replacement. *Microbiology*, 2000, 146(8): 1969–1975. [DOI]
- [58] Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM, Hasnain SE. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. *Infection*, 2004, 32(2): 109–111. [DOI]
- [59] Liu J, Takiff HE, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by *LfrA*, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol*, 1996, 178(13): 3791–3795. [DOI]
- [60] Velayati AA, Farnia P, Ibrahim TA, Haroun RZ, Kuan HO, Ghanavi J, Farnia P, Kabarei AN, Tabarsi P, Omar A, Vahrahram M, Masjedi MR. Differences in cell wall thickness between resistant and nonresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: using transmission electron microscopy. *Chemotherapy*, 2009, 55(5): 303–307. [DOI]
- [61] Cunningham AF, Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton  $\alpha$ -crystallin homolog. *J Bacteriol*, 1998, 180(4): 801–808. [DOI]
- [62] Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*, 1996, 64(6): 2062–2069. [DOI]
- [63] Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA,

- Maxwell A, Takiff HE, Blanchard JS. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science*, 2005, 308(5727): 1480–1483. [DOI]
- [64] Md Mahmudul Islam, H.M. Adnan Hameed, Julius Mugeru, Chiranjibi Chhotaray, Wang CW, Tan YJ, Liu JX, Li XJ, Tan SY, Iwao Ojima, Wing WY, Zhang TY. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy. *J Genet Genomics*, 2016, DOI: 10.1016/j.jgg.2016.10.002. [DOI]
- [65] Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results. *Eur Respir J*, 2005, 25(3): 564–569. [DOI]
- [66] Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, Acio M, Dunbar DF, Holmes TM, Rexer CH, Savthyakumar C, Vannier AM. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3): 748–752. [DOI]
- [67] Huang TS, Lee SSJ, Tu HZ, Huang WK, Chen YS, Huang CK, Wann SR, Lin HH, Liu YC. Use of MGIT 960 for rapid quantitative measurement of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex to ciprofloxacin and ethionamide. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 53(4): 600–603. [DOI]
- [68] Lu JM, Wang J, Huang XC, Hu ZY, Cui ZL. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-positive sputum. *Chin J Prev Med*, 2011, 45(1): 21–25. 陆俊梅, 王洁, 黄晓辰, 胡忠义, 崔振玲. 显微镜观察药物敏感性检测技术在痰标本直接药敏试验中的应用. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(1): 21–25. [DOI]
- [69] Shen XN, Zhao YL, Xiao HP. Research progress of phenotype detection of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Chin J Antituberc*, 2013, 35(6): 463–467. 申晓娜, 赵雁林, 肖和平. 结核分枝杆菌药物敏感性表型检测的研究进展. *中国防痨杂志*, 2013, 35(6): 463–467. [DOI]
- [70] Jacobs WR Jr, Barletta RG, Udani R, Chan J, Kalkut G, Sosne G, Kieser T, Sarkis GJ, Hatfull GF, Bloom BR. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, 1993, 260(5109): 819–822. [DOI]
- [71] Isfahani BN, Tavakoli A, Salehi M, Tazhibi M. Detection of rifampin resistance patterns in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Iran by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism and direct sequencing methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2006, 101(6): 597–602. [DOI]
- [72] Conn RB, Charache P, Chappelle EW. Limits of applicability of the firefly luminescence ATP assay for the detection of bacteria in clinical specimens. *Am J Clin Pathol*, 1975, 63(4): 493–501. [DOI]
- [73] Yan ZQ, Yang SL, Gong Y. Use of PCR related methods in detection of gene mutation. *Hereditas (Beijing)*, 2003, 25(2): 198–200. 颜志强, 杨胜利, 龚毅. PCR 及其衍生技术在基因突变检测中的应用. *遗传*, 2003, 25(2): 198–200. [DOI]
- [74] Xu ZY, Bao QY, Niu YX. Factors that influence direct sequencing of PCR products. *Hereditas (Beijing)*, 2002, 24(5): 548–550. 徐祖元, 包其郁, 牛宇欣. PCR 产物直接测序技术中影响因素的研究. *遗传*, 2002, 24(5): 548–550. [DOI]
- [75] Xu P, Gan MY, Gao Q. Current applications of next-generation sequencing technology in *Mycobacterium tuberculosis* research. *J Microb Infect*, 2015, 10(1): 54–60. 徐鹏, 甘明宇, 高谦. 二代测序技术在结核分枝杆菌研究中的应用进展. *微生物与感染*, 2015, 10(1): 54–60. [DOI]
- [76] Li WK, Li FY, Zhang SY, Cai B, Zheng N, Nie Y, Zhou D, Zhao Q. Automatic analysis pipeline of next-generation sequencing data. *Hereditas (Beijing)*, 2014, 36(6): 618–624. 李文轲, 李丰余, 张思瑶, 蔡斌, 郑娜, 聂宇, 周到, 赵倩. 基因组二代测序数据的自动化分析流程. *遗传*, 2014, 36(6): 618–624. [DOI]
- [77] Wu XQ, Lu Y, Zhang JX, Liang JQ, Zhang GY, Li HM, Lü CH, Ding BC. Detection of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using four molecular methods in China. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(7): 655–663. [DOI]
- [78] Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, Kop J, Owens MR, Rodgers R, Banada P, Safi H, Blake-more R, Lan NTN, Jones-López EC, Levi M, Burday M, Ayakaka I, Mugerwa RD, McMillan B, Winn-Deen E, Christel L, Dailey P, Perkins MD, Persing DH, Alland D. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(1): 229–237. [DOI]
- [79] Ajbani K, Nikam C, Kazi M, Gray C, Boehme C, Balan K, Shetty A, Rodrigues C. Evaluation of genotype MTBDRsl assay to detect drug resistance associated with fluoroquinolones, aminoglycosides and ethambutol on clinical sediments. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49433. [DOI]
- [80] World Health Organization. The use of molecular line probe assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: expert group meeting report. Geneva: World Health Organization, 2013. [DOI]