

世界卫生组织《结核分枝杆菌耐药相关基因突变目录及其临床应用指南》解读

王玉峰, 逢宇

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:82072243)

作者单位: 101149 北京,首都医科大学附属北京胸科医院细菌免疫室

作者简介: 王玉峰, 硕士研究生, 主管技师, 研究方向: 结核病实验室质量控制体系建设。E-mail: yufeng711@126.com

通信作者: 逢宇, 博士研究生, 教授, 研究员, 博士研究生导师, 研究方向: 结核病耐药机制及分子流行病学研究。E-mail: pangyupound@163.com



逢宇, 博士研究生, 首都医科大学附属北京胸科医院细菌免疫室主任, 教授, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事结核病耐药机制及分子流行病学研究。任中华医学会结核病学分会委员兼副秘书长, 中华医学会结核病学分会潜伏感染专委会主任委员, 中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会副主任委员, 中华医促会结核病学分会基础学组副组长, 中国老年及老年医学学会呼吸分会常委, 中国防痨协会基础分会副秘书长等。主持国家自然科学基金项目、传染病重大专项等多项课题, 获得省部级奖励6项, 入选北京市百千万人才工程人才, 荣获北京市“科技新星”、北京市组织部“青年拔尖人才”“登峰人才”等多个荣誉称号。在国际知名期刊以第一作者或者通信作者发表SCI收录文章150余篇, 总影响因子超过600分。

[摘要] 耐药结核病是我国面临的重大公共卫生问题。分子诊断技术的不断发展促进了耐药结核病患者的早期诊断, 但是不同耐药相关基因突变类型结果的解读成为分子耐药诊断领域的首要挑战。世界卫生组织于2021年出版了《结核分枝杆菌耐药相关基因突变目录及其临床应用指南》, 旨在规范结核分枝杆菌分子耐药结果解读, 特别是对于基于二代测序技术获得的结核分枝杆菌菌株获得的突变信息进行深入剖析, 以期临床提供更准确的耐药检测报告, 也为耐药结核分子诊断技术在中国的推广使用奠定基础。

[关键词] 结核分枝杆菌; 药物敏感性试验; 耐药; 高通量测序

[中图分类号] R 378.91⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2022)10-0900-07

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2022.10.03

Interpretation of Catalogue of Mutations in Mycobacterium Tuberculosis Complex and Their Association with Drug Resistance published by World Health Organization WANG Yu-feng, PANG Yu. Department of Bacteriology and Immunology, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University, Beijing 101149, China

[Abstract] Drug-resistant tuberculosis is a major public health problem in China. The continuous development of molecular diagnostic technology has promoted the early diagnosis of drug-resistant tuberculosis patients, but the interpretation of the results of different drug resistance-related gene mutation types has become the primary challenge in the field of molecular drug resistance diagnosis. In 2021, World Health Organization published *Catalogue of Mutations in Mycobacterium Tuberculosis Complex and Their Association with Drug Resistance*, aiming to standardize the interpretation of molecular drug resistance results of Mycobacterium tuberculosis, especially to conduct in-depth analysis of mutation information obtained by Mycobacterium tuberculosis strains based on the next generation sequencing technology, so as to provide more accurate drug resistance detection report for clinical use. It also lays a foundation for the popularization and use of molecular diagnostic technology for drug-resistant tuberculosis in China.

[Key words] Mycobacterium tuberculosis; Drug susceptibility testing; Drug resistance; High-throughput sequencing

2019 年全球约 140 万人死于结核病(tuberculosis), 约 1 000 万人发展为活动性结核病, 其中约 50 万活动性结核患者对利福平(rifampin, RIF) 耐药, 100 万患者 RIF 敏感而异烟肼(isoniazid, INH) 耐药。因此, 使用各种检测工具迅速、准确地检测患者对这两种药物耐药性, 以尽快制定合适的治疗方案至关重要^[1]。传统药敏试验受限于结核分枝杆菌生长缓慢, 往往需要 2~3 个月才能获得结果, 无法满足临床对耐药患者即时诊断的需求, 也造成患者治疗的延迟和潜在的耐药结核传播风险。随着快速诊断工具的发展, 尤其对 RIF 耐药性的分子生物学检测有了显著改善, 且仪器设备要求低、操作简便^[2]。2012 年, 全球只有 7% 经细菌学确诊的结核病患者进行了 RIF 耐药性检测, 而到 2019 年有近 61% 进行了检测。但同期开始接受耐多药或 RIF 耐药结核病治疗的人数从 77 321 例增加到 177 099 例, 增加了近 129%。因此, 快速、准确的耐药性检测在制定结核病治疗方案时至关重要^[1,3]。RIF 耐药性分子基础主要是 RIF 耐药决定区(rifampicin resistance-determining region, RRDR) 的突变, 其为一个 81 个碱基对片段^[4]。发现并认知此类耐药性基因片段及新的分子工具的研究和开发, 对于解决耐药性检测方案起到重要作用^[5]。2020 年世界卫生组织(World Health Organization, WHO) 建议对所有结核病患者的 RIF 和 INH 耐药性进行常规检测, 而对耐多药患者常规进行氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQs) 耐药性检测^[5]。目前对 INH 和 FQs 的耐药机制研究比较清楚, 且已有相应耐药性检测的商品化分子生物学检测工具^[6], 但这些药物的基因型药敏检测(drug-susceptibility testing, DST) 的敏感度低于 RIF 的敏感度, 因此需额外的表型 DST 来检测基因型 DST 遗漏的耐药性^[5]。在结核病药物研发长期停滞之后, 多种新药的陆续上市及现有抗菌药物的再利用, 使结核病尤其是耐药结核病的治疗方案有了巨大改进。随着抗结核新药和旧药新用在耐药结核病治疗的推广应用, 耐药性也随之增加, 因此急需快速检测患者的耐药情况, 以选择合适的药物组合方案。然而, 目前对这些药物耐药的分子机制仍然知之甚少, 由于耐药菌株整体数量较少, 部分耐药相关基因突变位点及其与耐药表型的相关性在不同研究得出的结果不尽相同^[7]。对于这些新型耐药相关基因突变位点与耐药表型结果的解读将提升分子诊断技术在耐药结核中的应用价值。近年来, 测序技术发展迅速, 二代及三代测序技术广泛用于基因型 DST, 潜力巨大^[7]。其中包括全基因组测序(whole-genome sequencing, WGS), 测

序对象为培养的临床分离株, 若直接对临床样本检测, 可对所有遗传物质进行测序, 包括大量人类和其他共生生物的 DNA。基于二代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS) 的基因型 DST 工具的开发和诊断效能评价, 其主要限制是缺乏标准化、覆盖全面的基因突变及其与耐药性关联的分类, 可供诊断工具开发者及临床检测人员使用。关于基因组中不同药物耐药性决定区域的数量、鉴别和临床解释, 随着该领域研究在持续更新, 但耐药性决定区的暂时不确定性, 限制针对该区域检测工具的开发, 尤其是对于新药和旧药新用的药物^[2,8]。因此, 急需准确、全面的结核分枝杆菌表型耐药相关基因突变目录, 以区分临床耐药变异与耐药无关变异。鉴此, WHO 在 2021 年出版了《结核分枝杆菌耐药相关基因突变目录及其临床应用指南》(以下简称《指南》), 以推进新药的基因型 DST、表型 DST、测序数据相互识别, 并更好地理解与耐药表型相关的突变。《指南》基于已发表的数据, 对迄今为止最大的多国结核分枝杆菌复合群(Mycobacterium tuberculosis complex, MTBC) 分离株(>38 000) 的 WGS 和表型数据进行分析, 用于从遗传数据预测临床相关耐药表型。该突变目录解释所有一线药物[RIF、INH、乙胺丁醇(ethambutol, EMB) 和吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)] 以及二线药物[左氧氟沙星(levofloxacin, LFX)、莫西沙星(moxifloxacin, MFX)、贝达喹林(bedaquiline, BDQ) 和利奈唑胺(linezolid, LZD)]、B 组药物[氯法齐明(clofazimine, CFZ)]、C 组药物[德拉马尼(delamanid, DLM)、阿米卡星(amikacin, AMK)、链霉素(streptomycin, STM)、乙硫异烟胺(ethionamide, ETO) 和丙硫异烟胺(protothionamide, PTO)] 的耐药性提供了常见的标准化参考。

1 高质量的表型药敏和基因序列数据是纳入《指南》研究的首要因素

1.1 表型药敏试验方法及基因测序结果解读注意事项 创建结核耐药基因突变目录的基础为收集的数据, 包括表型 DST 和培养的 MTBC 分离株的 WGS, 以下四个主要目录组成要素至关重要:

1.1.1 高质量表型 DST 确保采用最佳表型 DST 结果作为参考, 由于结核杆菌表型 DST 方法优劣及临界浓度(critical concentrations, CCs) 可能随时间不断变化。因此, 对于具有多重表型 DST 结果的 MTBC 分离株, 优选当前 WHO 推荐的表型 DST 方法, 之前或非 WHO 推荐方法次之。新药及旧药新用类药物使用微量肉汤稀释法(broth microdilution, BMD) DST 检测数据较多, 但 WHO 尚未推荐此方法及相应解释

标准,因此,该方法仅能“暂定”用于基因突变与表型耐药关联。基于以上表型 DST 在应用方面存在多种情况,兼顾 WHO 推荐的表型 DST 方法及文献发表的数据,将表型 DST 结果的可信度类别分为 4 类(由《指南》自行定义,第 1 类为 WHO 当前推荐的表型 DST 方法,第 2 类方法为 WHO 当前和之前推荐的表型 DST 方法,第 3 类指其他表型 DST 方法,主要为 BMD 法,第 4 类为 1~3 类之外的其他表型 DST 方法),第 1 类(WHO 当前推荐)、第 1 和第 2 类(WHO 当前和之前推荐)和第 1、第 2 及第 3 类(几乎所有方法)的表型 DST 数据进行了单独的关联分析^[4,9-10]。见表 1。许多 MTBC 分离株采用一种以上的 DST 方法获得表型 DST 结果,在这些情况下,需制定一个表型 DST 优先选择的顺序,只包括 WHO 最近推荐的表

型 DST 数据。当用同一分离株的一种药物的不同方法获得的表型 DST 结果都可用时,使用以下优选规则:(1)1 类>2 类>3 类。(2)在同一类别中,固体培养基结果优于液体培养基结果,液体培养基更容易错过关键的、临床相关的 rpoB 突变^[11]。(3)在同一类别的液体方法中,分枝杆菌生长培养系统(BACTEC™ Mycobacterial Growth Indicator Tube™ 960, MGIT) > 显微镜观察下耐药检测方法(microscopic observation drug-susceptibility assay, MODS) > BACTEC™ 460 > CRyPTIC, 但 BACTEC™ 460 不再使用,而 MGIT 比 MODS 有更多的试验进行了验证^[12-13]。此类优先选择规则仅对同一菌株使用同一类别的表型 DST 方法检测结果可信度进行判断时适用,可获得标准化的数据类型。

表 1 四种不同可信度类别初步判定依据

类别	是否为当前 WHO 推荐	是否为之前 WHO 推荐	L-J 固体培养法	MODS	7H10	7H11	BACTEC MGIT 液体培养法	BMD	BACTEC™ 460	其他方法
1 类	√		√	√	√	√	√			
2 类		√	√		√	√	√		√	
3 类								√		
4 类										√

注:若选项为是用√标记,否则不填写

1.1.2 高质量、标准化的 WGS,用于生成无偏倚的原始序列数据 本次分析仅包括使用 Illumina 仪器生成的 WGS 数据。该平台是目前使用最广泛的,并提供标准化测序数据,且以原始测序读取数据的输出文件作为生物信息学分析的起点。

1.1.3 用于变异检测和注释的标准化生物信息学通路 为了确保在所有数据源中统一识别突变,使用标准化的生物信息通路去除非结核的数据,通过质量检查处理数据,将读取数据与 H37Rv 参考基因组对比,最后识别突变。该通路的设计目的是最大限度地检测单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)和插入/缺失的变异检测,在此阶段可排除 < 90% 主要变异的耐药分离株。

1.1.4 标准化的、有效的方法识别与耐药性表型相关的变异 对匹配的表型和基因型数据进行算法处理,以识别基因单突变,该突变可清楚地解释观察到的耐药表型。然后对所有突变和表型的最终数据进行统计评估,确定该变异与耐药性的相关性的比值比(odds ratio, OR)和阳性预测值。

1.2 不同抗结核药物表型 DST 结果展示 每个分离株的表型 DST 结果数量不同,其中 4 种一线药物(RIF、INH、EMB 和 PZA)的结果最常见(见表 2)。表

中 ALL 数据集包括基于 WHO 认可的方法(WHO 数据集)和未经 WHO 认可方法的表型 DST,后者以 BDQ、CFZ、DLM 和 LZD 为主,但对此类新药或者旧药新用药物的耐药率 ≤ 1.2%。除 BDQ 和 DLM 外,所有药物的 ALL 数据集中的分离株均超过 1 万株,部分药物的分离株超过 3 万株。对 RIF 和 INH 的耐药率为 24%~36%,而 FQs 为 14%~20%,这个比率取决于药物种类和数据来源。有超过 15 000 株分离株评估 PZA 的耐药性,其中 14.6%通过 WHO 认可的方法具有耐药性。WHO 数据集中的耐药率从 CFZ 的 0.6%到 ETO 的 40.5%。而在 ALL 数据集中耐药率范围从 BDQ 的 0.9%到 INH 的 35.4%。

表 2 按照药物种类和收集数据来源的表型 DST 结果汇总

药物	数据来源*	分离株总数	耐药菌株数	耐药率(95% CI)
RIF	WHO	27063	6736	24.9(24.4~25.4)
	ALL	34375	9868	28.7(28.2~29.2)
INH	WHO	26727	8440	31.6(31.0~32.1)
	ALL	34437	12199	35.4(34.9~35.9)
EMB	WHO	23706	3615	15.2(14.8~15.7)
	ALL	30708	4900	16.0(15.5~16.4)
PZA	WHO	15903	2329	14.6(14.1~15.2)
	ALL	15902	2329	14.6(14.1~15.2)

续表 2

药 物	数据来源*	分离株总数	耐药菌株数	耐药率 (95% CI)
LFX	WHO	10305	2019	19.6(18.8~20.4)
	ALL	18277	3108	17.0(16.5~17.6)
MFX	WHO	6904	1094	15.8(15.0~16.7)
	ALL	13351	1869	14.0(13.4~14.6)
BDQ	WHO	88	3	3.4(0.7~9.6)
	ALL	8321	73	0.9(0.7~1.1)
LZD	WHO	1131	9	0.8(0.4~1.5)
	ALL	11018	123	1.1(0.9~1.3)
CFZ	WHO	3635	23	0.6(0.4~0.9)
	ALL	10179	125	1.2(1.0~1.5)
DLM	WHO	89	2	2.2(0.3~7.9)
	ALL	7778	82	1.1(0.8~1.3)
AMK	WHO	8040	664	8.3(7.7~8.9)
	ALL	16978	1288	7.6(7.2~8.0)
STM	WHO	9043	2562	28.3(27.4~29.3)
	ALL	13984	4635	33.1(32.4~33.9)
ETO	WHO	2184	884	40.5(38.4~42.6)
	ALL	13918	2965	21.3(20.6~22.0)
KAN [#]	WHO	7381	688	9.3(8.7~10.0)
	ALL	16154	1481	9.2(8.7~9.6)
CAP [#]	WHO	9103	702	7.7(7.2~8.3)
	ALL	11526	970	8.4(7.9~8.9)

注:KAN:卡那霉素(kanamycin);CAP:卷曲霉素(capreomycin);*表型 DST 数据来源:WHO 数据集包括根据当前或以前的 WHO 指南获得的表型 DST 结果,而 ALL 数据集包括通过未经 WHO 认可的其他方法获得的结果;[#]该类药物不再推荐用于抗结核治疗

2 基于循证医学建立的结核分枝杆菌耐药相关基因突变目录

对收集的所有 MTBC 分离株同时具有 WGS 数据和表型 DST 结果进行了分析。不同药物的突变基因

表 3 基于 ALL 数据集不同基因突变预测表型 DST 耐药性结果的敏感度、特异度和阳性预测值

药 物		组 1: 耐药性相关	组 2: 暂定耐药性相关	组 3: 不确定耐药性	组 4: 与暂定耐药性无关	组 5: 与耐药性无关
RIF	鉴定基因突变数量	24	111	1550	0	28
	敏感度(% ,95% CI)	92.3(91.8~92.8)	3.5(3.2~3.9)			
	特异度(% ,95% CI)	98.3(98.1~98.5)	99.8(99.8~99.8)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	95.6(95.2~96.0)	88.7(85.2~91.7)			
INH	鉴定基因突变数量	5	118	2252	6(1)	22
	敏感度(% ,95% CI)	90.0(89.4~90.5)	2.8(2.5~3.1)			
	特异度(% ,95% CI)	98.5(98.4~98.7)	99.9(99.8~99.9)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	97.1(96.8~97.4)	91.8(88.6~94.4)			
EMB	鉴定基因突变数量	14	1	2641	5	39
	敏感度(% ,95% CI)	86.3(85.3~87.3)	0.4(0.2~0.6)			
	特异度(% ,95% CI)	93.3(93.0~93.6)	100.0(99.9~100.0)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	71.1(69.9~72.2)	72.0(50.6~87.9)			

预测表型 DST 结果,用敏感度、特异度和阳性预测值三个指标进行区分(见表 3)。三种指标通过关联水平(组 1 为耐药性相关,组 2 为暂定耐药性相关)以及综合评价来表示,阐明不同基因突变对表型 DST 耐药相关性的贡献。预测表型 DST 耐药结果的突变可能不够全面准确,因为参考标准不完善、药物关键浓度随着时间的变化、从数百个不同实验室收集的表型 DST 数据时可能存在的一些问题。此外,KAN 和 CAP 仅供参考,此类药物不再被推荐用于抗结核治疗。对于大多数药物来说,组 1 和组 2 的突变组合的敏感度 $\geq 75%$,特异度 $\geq 95%$ 。组 1 中 24 个耐 RIF 突变的敏感度为 92.3%,阳性预测值为 95.6%,而组 1 中 5 个突变对 INH 的联合敏感度为 90.0%,阳性预测值为 97.1%。组 1 中 9 个突变对 MFX 的敏感度为 87.3%,14 个突变对 EMB 的敏感度为 86.3%。ALL 数据集中很少有分离株对新药和旧药新用药物有耐药性,对这些药物的耐药性关联还不明确。其中一些药物的特异度低于预期,可能因表型参考或所使用的解释标准有差异。组 2 中基因突变对大多数药物的预测性能没有较大影响,但使与 PZA 和 ETO 耐药相关基因检测的敏感度分别从 56.8%、47.2% 上升到 72.3%、75.7% (为组 1 和组 2 耐药相关基因检测综合敏感度)。耐药性产生通常仅与几个关键的突变相关,这一尝试促进了快速核酸扩增检测的发展,显然,全面的分子 DST-WGS 将成为一种理想的新方法,可以覆盖更多的基因。此外,尽管每个突变可能并不总是能导致表型 DST 结果为耐药性,但多个突变的累积效应可能会产生耐药情况。随着更多的数据和证据的验证,预计一些与暂定耐药性相关的突变可能会转移到第 1 组,一些意义不确定的突变可能被发现与耐药性或者暂时耐药性有关,推动该领域进一步发展。

续表 3

药 物		组 1: 耐药性相关	组 2: 暂定耐药性相关	组 3: 不确定耐药性	组 4: 与暂定耐药性无关	组 5: 与耐药性无关
PZA	鉴定基因突变数量	105	233(5)	775	16(1)	15
	敏感度(% ,95% CI)	56.8(54.8~58.8)	15.6(14.2~17.2)			
	特异度(% ,95% CI)	99.1(99.0~99.3)	99.6(99.5~99.7)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	91.9(90.4~93.3)	88.1(84.6~91.1)			
LFX	鉴定基因突变数量	8	6	672	2	14
	敏感度(% ,95% CI)	72.3(70.5~74.2)	2.4(1.9~3.0)			
	特异度(% ,95% CI)	98.8(98.6~99.0)	99.6(99.5~99.7)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	91.1(89.7~92.3)	54.8(46.0~63.4)			
MFX	鉴定基因突变数量	9	5	552	2	11
	敏感度(% ,95% CI)	87.3(85.7~88.8)	1.3(0.8~1.9)			
	特异度(% ,95% CI)	91.8(91.3~92.3)	99.7(99.6~99.8)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	63.6(61.7~65.4)	40.0(27.6~53.5)			
BDQ	鉴定基因突变数量	0	0	553	0	4
LZD	鉴定基因突变数量	1	0	403	0	2
	敏感度(% ,95% CI)	38.2(29.6~47.4)				
	特异度(% ,95% CI)	99.8(99.8~99.9)				
	阳性预测值(% ,95% CI)	73.4(60.9~83.7)				
CFZ	鉴定基因突变数量	0	0	601	0	7
DLM	鉴定基因突变数量	0	1	359	0	0
	敏感度(% ,95% CI)		6.1(2.0~13.7)			
	特异度(% ,95% CI)		100.0(99.9~100.0)			
	阳性预测值(% ,95% CI)		83.3(35.9~99.6)			
AMK	鉴定基因突变数量	2	2	1543	0	24
	敏感度(% ,95% CI)	76.4(74.0~78.7)	0.9(0.4~1.5)			
	特异度(% ,95% CI)	99.1(98.9~99.2)	99.9(99.9~100.0)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	87.4(85.3~89.3)	47.8(26.8~69.4)			
STM	鉴定基因突变数量	12	166	1327	1(1)	15
	敏感度(% ,95% CI)	75.2(73.9~76.4)	7.8(7.0~8.6)			
	特异度(% ,95% CI)	98.0(97.6~98.2)	97.5(97.1~97.8)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	94.8(94.0~95.5)	60.5(56.4~64.4)			
ETO	鉴定基因突变数量	4	327	1099	0	0
	敏感度(% ,95% CI)	47.2(45.3~49.0)	34.3(32.6~36.0)			
	特异度(% ,95% CI)	95.8(95.4~96.2)	95.5(95.1~95.9)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	75.2(73.2~77.2)	67.3(64.9~69.7)			
KAN [#]	鉴定基因突变数量	7	1	594	1	12
	敏感度(% ,95% CI)	72.9(70.6~75.2)	0.3(0.1~0.7)			
	特异度(% ,95% CI)	98.4(98.2~98.6)	100.0(100.0~100.0)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	82.4(80.3~84.5)	66.7(22.3~95.7)			
CAP [#]	鉴定基因突变数量	5	33	1009	0	20
	敏感度(% ,95% CI)	64.3(61.2~67.3)	5.1(3.8~6.6)			
	特异度(% ,95% CI)	98.5(98.2~98.7)	99.8(99.8~99.9)			
	阳性预测值(% ,95% CI)	79.4(76.4~82.2)	75.4(63.1~85.2)			

注: [#]此类药物不再被推荐用于抗结核治疗;INH、PZA 和 STM 括号中的菌株数未进行计算,因这些分离株中未发现突变,是根据之前 WHO 指南或文献纳入统计的

3 未来基因突变目录的更新与修订注意事项

3.1 分析的数据类型 (1) 当前治疗指南表明, 耐 INH 和 MFX 水平显著影响治疗效果, 例如高剂量 INH 可能用于单独 INH 低水平耐药治疗, 高水平耐药突变的 MFX 不能使用高剂量 MFX 治疗^[5]。(2) 应评估所使用药物的有效性, 特别是当抗生素的剂量发生改变^[4]。(3) 一些突变仅导致最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 值的适度增加, 使用可信度类别表型 DST 进行分类时比较困难, 理想情况下, 应该分析个体突变模式, 像欧洲抗菌药物敏感性试验委员会所定义的“技术不确定性领域”的突变类型, 以尽量减少主要表型 DST 结果错误^[4, 14-15]。(4) 收集更大量、更合适的数据, 尽量收集准确测试方法和合理结果解释的基因型数据, 例如特定 *rrl* 突变导致 LZD 耐药^[7, 16-17]。*rpoB* T427A 虽然在 RRDR 中, 但可能不产生 RIF 抗性^[18]。

3.2 分级标准 (1) 鉴于几个关键药物 (如 BDQ 和 DLM) 的耐药基因与表型 DST 结果数据极少, 放宽分级标准和 (或) 根据新的专家规则进行分类, 类似用于 PZA 和 *pncA* 耐药性分析^[7]。(2) 需用其他方法来对补偿机制进行分类。(3) 基因的选择和相应的调控区域必须根据最新的科学证据进行修改。例如, Rv1979c 在 CFZ 和 BDQ 耐药性中的作用就受到了质疑^[7-8]。(4) 同义突变与耐药性无关, 除非如终止起始密码子发生在 *fabG1* 或 Rv3793 中, 需进行核查并根据研究结果, 在以后的修订版中可能会进行不同的处理^[19-20], 类似于核苷酸变化但未导致相应氨基酸发生改变的情况^[16]。

3.3 生物信息学路径 (1) 应评估和研究具有不同耐药性等位基因的分离株。(2) 在当前的算法中没有识别出较大的插入序列, 这导致一些突变错误地出现为单突变, 如 *ahpC* 启动子突变 (如 C-57T 突变), 同样在目前的分析中没有考虑到终止密码子的消除。(3) 探索数据筛选失败的确切影响因素和对分析结果影响的程度。

3.4 如果发现耐药性标记, 应进行确认试验 (1) 考虑表型 DST 的重现性、所使用的临界点的准确性和耐药率。(2) 一个突变是否导致 MIC 值接近临界点。(3) 根据专家共识或 WHO 之前对某些突变进行分类, 这可能是不正确的。例如, 在 *ethA*、*gid*、*katG* 或 *pncA* 的实际终止密码子之前的一个密码子的无义突变不太可能产生耐药性, 这些例外可以通过实验或结构建模来确定^[21]。

4 展望

基于分子诊断技术的耐药结核病早期诊断对于

有效控制结核病具有重要的意义。传统基于分子信标、反向杂交、熔解曲线等鉴定耐药突变位点的分子诊断技术, 通过对耐药的高频位点进行检测实现了对 RIF、INH、FQs 耐药性的精准早期检测, 目前在临床中发挥了重要的作用^[22]。近年来, 随着测序技术的普及, 临床可以在 1~2 d 内获得覆盖位点更广泛、涵盖药物种类更多的耐药相关基因序列信息, 《指南》为高通量多靶点耐药结核检测方法的临床应用提供了重要的数据解读依据, 但是《指南》在制定规程中还存在一定的不足: 首先, 表型 DST 是《指南》的分析基础, 尽管《指南》对表型 DST 结果进行了优先等级划分, 但是部分药物缺乏有效的关键浓度是制约后续分析的关键因素; 特别是 MFX, 在 2014—2018 年, MFX 以 2.0 mg/L 作为关键浓度, 而后其降低到 0.5 mg/L, 关键浓度的异质性将极大地影响对耐药突变结果的解读^[10, 23]。其次, 对于不同突变位点对耐药的影响, 《指南》提供了不同程度的可信度推荐, 而这正是基于对于既往文献数据的汇总。因此, 部分罕见位点即便是引起高水平耐药, 但是由于证据较少, 在推荐等级上也偏低。此外, 部分抗结核新药耐药菌株较少, 也造成其耐药突变分析的难度, 因此亟待扩充针对罕见突变以及抗结核新药的耐药突变的全球数据, 以完善《指南》。再次, 《指南》获取的分子数据基于 WGS 的结果, 由于研究成本原因, 上述数据主要来自于结核病低负担国家, 而不同国家流行的优势结核分枝杆菌谱系存在显著差异, 提高菌株的代表性以覆盖结核病高负担国家的优势谱系将是值得重点关注的方向。未来应该聚焦于采集更多的关于新药及旧药新用药物的表型耐药信息, 并开展体内 (in vivo) 和体外 (in vitro) 筛选试验。今后的分析应该聚焦于结合 MIC 揭示单个突变间的以及几组突变间的关联。这样的数据将有助于分子诊断技术指导个性化的单个药物剂量制定。WHO 计划对本分类定期修订, 并尝试着将这些科研进展促进公共卫生应对举措并填补其空白。

参考文献

- [1] Global tuberculosis report 2020 [EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2020 [2021-01-10]. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>.
- [2] Mohamed S, Köser CU, Salfinger M, et al. Targeted next-generation sequencing: a Swiss army knife for mycobacterial diagnostics? [J]. Eur Respir J, 2021, 57(3):2004077.
- [3] Global tuberculosis report 2013 [EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2013 [2021-04-12]. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/91355/9789241564656_eng.pdf.
- [4] Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing

of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine [EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2021 [2021-02-05]. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1330649/retrieve>.

[5] WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis-rapid diagnostics for tuberculosis detection[EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2020[2020-06-30]. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1284635/retrieve>.

[6] Miotto P, Tessema B, Tagliani E, et al. A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Eur Respir J*, 2017,50(6):1701354.

[7] Kadura S, King N, Nakhoul M, et al. Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020,75(8):2031–2043.

[8] Schön T, Miotto P, Köser CU, et al. *Mycobacterium tuberculosis* drug-resistance testing: challenges, recent developments and perspectives [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017,23(3):154–160.

[9] Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis (WHO/CDS/TB/2018.5)[EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2018 [2021-01-10]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260470/1/WHO-CDS-TB-2018.5-eng.pdf>.

[10] Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis (WHO/CDS/TB/2018.24)[EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2018 [2018-10-17]. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/275469/9789241514842-eng.pdf>.

[11] Torrea G, Ng KCS, Van Deun A, et al. Variable ability of rapid tests to detect *Mycobacterium tuberculosis* rpoB mutations conferring phenotypically occult rifampicin resistance[J]. *Sci Rep*, 2019,9(1):11826.

[12] Noncommercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening patients at risk for multidrug-resistant tuberculosis. Policy statement [EB/OL]. Geneva: World Health Organization; 2011 [2021-03-20]. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44601/9789241501620-eng.pdf>.

[13] Martin L, Coronel J, Faulx D, et al. A field evaluation of the Hardy TB MODS Kit™ for the rapid phenotypic diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis [J]. *PLoS One*, 2014,9(9):e107258.

[14] Beckert P, Sanchez-Padilla E, Merker M, et al. MDR *M. tuberculosis* outbreak clone in Eswatini missed by Xpert has elevated bedaquiline resistance dated to the pre-treatment era[J]. *Genome Med*, 2020,12(1):104.

[15] Nimmo C, Millard J, Brien K, et al. Bedaquiline resistance in drug-resistant tuberculosis HIV co-infected patients[J]. *Eur Respir J*, 2020,55(6):1902383.

[16] Köser CU, Cirillo DM, Miotto P. How to optimally combine genotypic and phenotypic drug susceptibility testing methods for pyrazinamide[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020,64(9):e01003–20.

[17] Nakatani Y, Opel-Reading HK, Merker M, et al. Role of alanine racemase mutations in *Mycobacterium tuberculosis* D-cycloserine resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017,61(12):e01575–17.

[18] Köser CU, Georghiou SB, Schön T, et al. On the consequences of poorly defined breakpoints for rifampin susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *J Clin Microbiol*, 2021,59(4):e02328–20.

[19] Ando H, Miyoshi-Akiyama T, Watanabe S, et al. A silent mutation in mabA confers isoniazid resistance on *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Mol Microbiol*, 2014,91(3):538–547.

[20] Safi H, Lingaraju S, Amin A, et al. Evolution of high-level ethambutol-resistant tuberculosis through interacting mutations in decaprenylphosphoryl-β-D-arabinose biosynthetic and utilization pathway genes[J]. *Nat Genet*, 2013,45(10):1190–1197.

[21] Grant SS, Wellington S, Kawate T, et al. Baeyer-Villiger monooxygenases EthA and MymA are required for activation of inhibitors against replicating and non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Cell Chem Biol*, 2016,23(6):666–677.

[22] 逢宇,王玉峰,高兴辉,等. 结核分枝杆菌实验室检测产品和技术应用进展[J]. *中国临床新医学*, 2021,14(1):23–34.

[23] Ajileye A, Alvarez N, Merker M, et al. Some synonymous and non-synonymous gyrA mutations in *Mycobacterium tuberculosis* lead to systematic false-positive fluoroquinolone resistance results with the Hain GenoType MTBDRsl assays[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017,61(4):e02169–16.

[收稿日期 2022-10-13][本文编辑 吕文娟 余军]

本文引用格式

王玉峰,逢宇. 世界卫生组织《结核分枝杆菌耐药相关基因突变目录及其临床应用指南》解读[J]. *中国临床新医学*, 2022,15(10):900–906.