

严重后果源於一个不常见的变异

充满挑战的抗结核治疗之路?

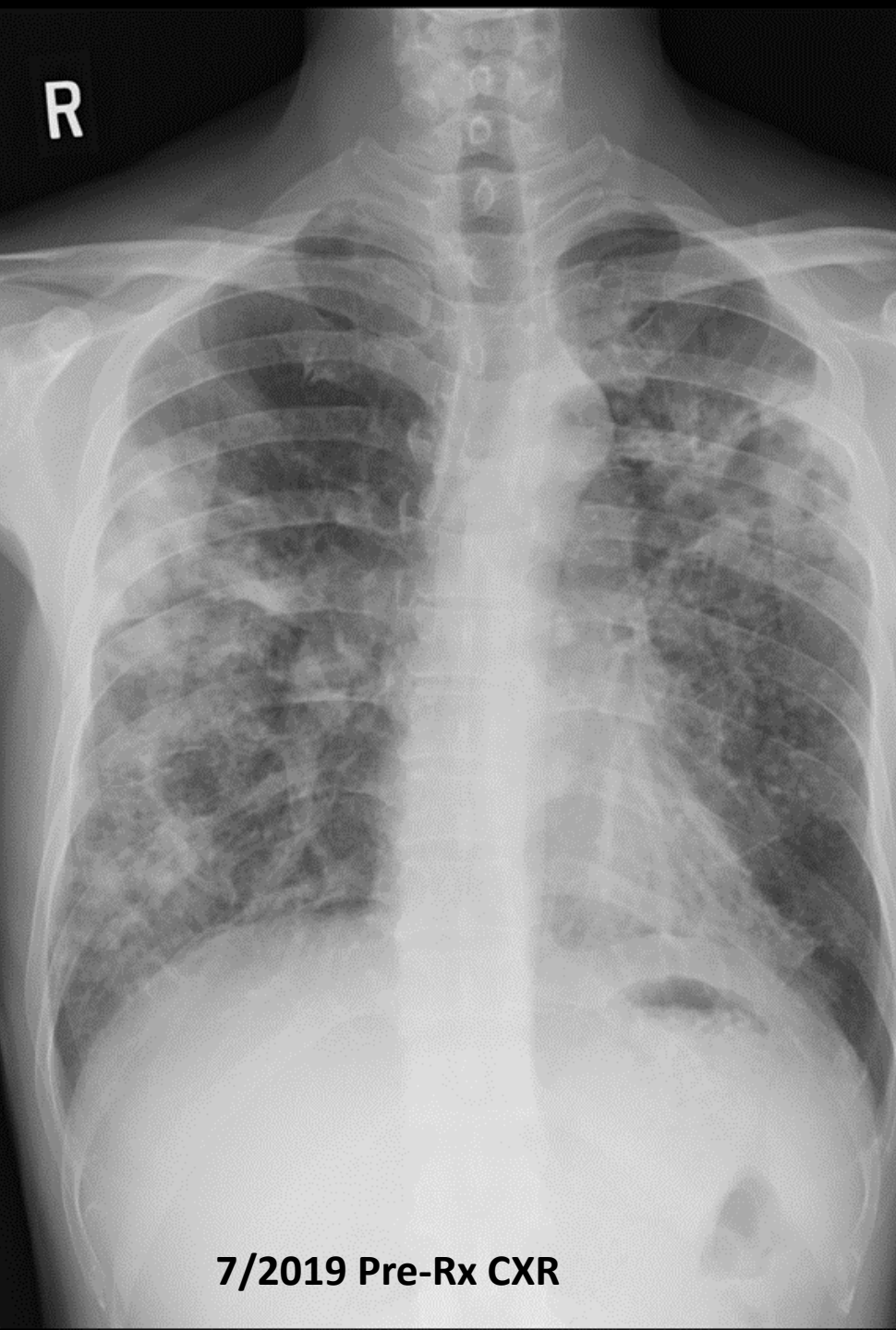
林辉文医生

香港葛量洪医院

结核暨胸肺内科部

病历

- 54岁男性电工
- 7/2019慢性咳嗽
- 六个月内体重57kg→43kg.
- 病史
 - 36岁开始患糖尿病. HbA1c 5.2.
 - >10年前妻子曾患肺结核病並順利完成治疗。

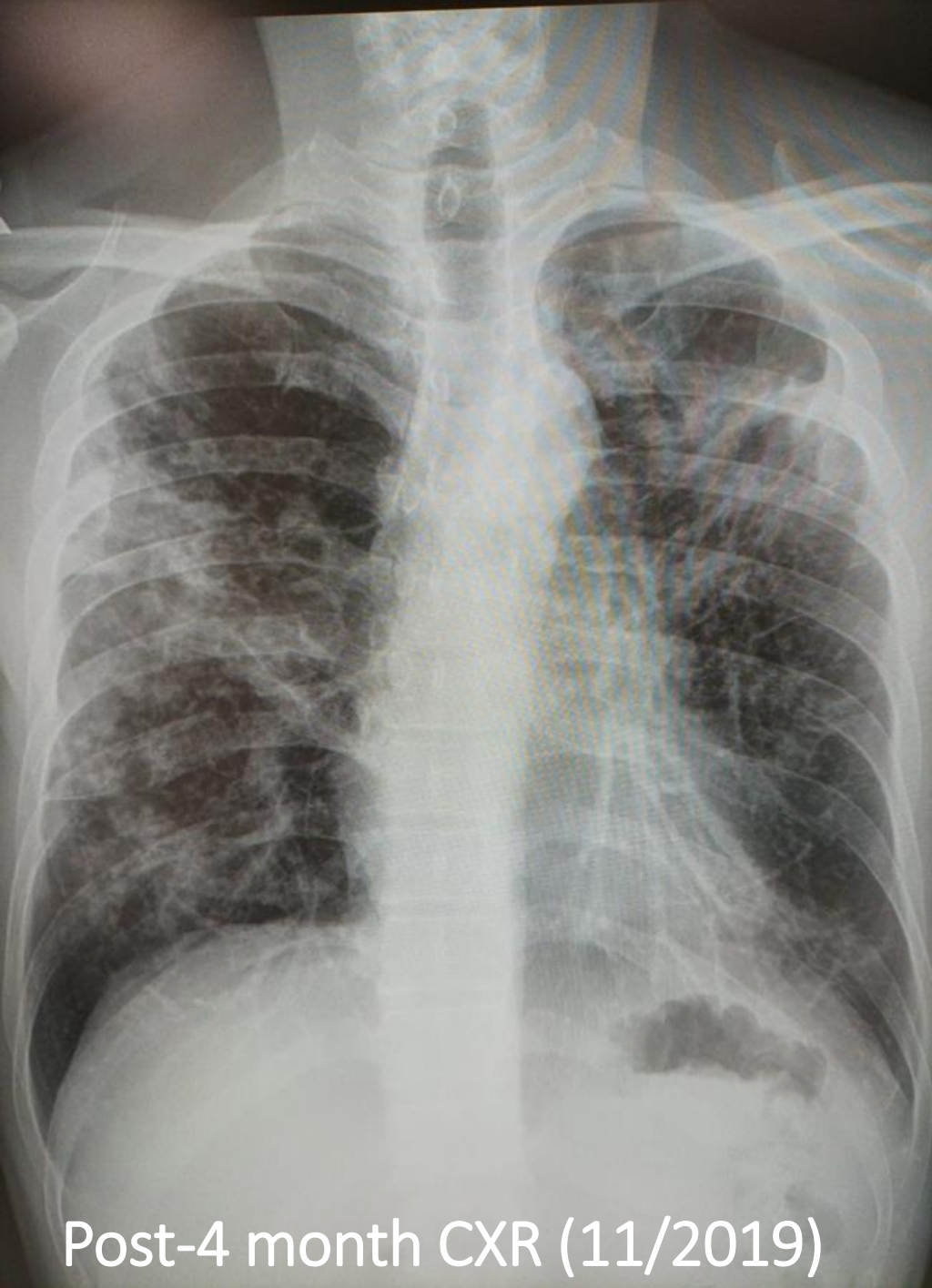


7/2019 Pre-Rx CXR

-
- CXR: 两肺广泛阴影和空洞
 - 人类免疫缺乏病毒HIV / 乙肝病毒HBsAg 检测阴性
 - **痰抗酸杆菌涂阳**
 - 开始包含异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺四种一线抗痨药物的监管治疗
 - 7/2019 痰培养药敏结果: 并没对一线药物耐药.

治疗进展

- 10/2019三个月后痰涂片仍然阳性
- 11/2019四个月治疗后痰转涂阴/培养转阴
- 虽然肺部x光有轻微好转，整体好转非常缓慢。
- 12/2019四个月治疗后, 停药吡嗪酰胺, 继续以异烟肼、利福平、乙胺丁醇治疗



- 但卻隨即再次培养出结核菌, 并且对异烟肼呈耐药!



- Hain检测:
 - 异烟肼 *inhA* 变异呈阳,
 - 但没有发现对其它药物包括利福平 *rpoB*、左氧氟沙星 *gyr A&B*、氨基糖苷类, 包括 *rrs* & *eis* 的变异。跟药敏报告吻合。
- 因此药物被改为治疗异烟肼单一耐药的标
准组合: 利福平、左氧氟沙星、乙胺丁醇、
吡嗪酰胺 [RLEZ]。

Post-4 month CXR (11/2019)

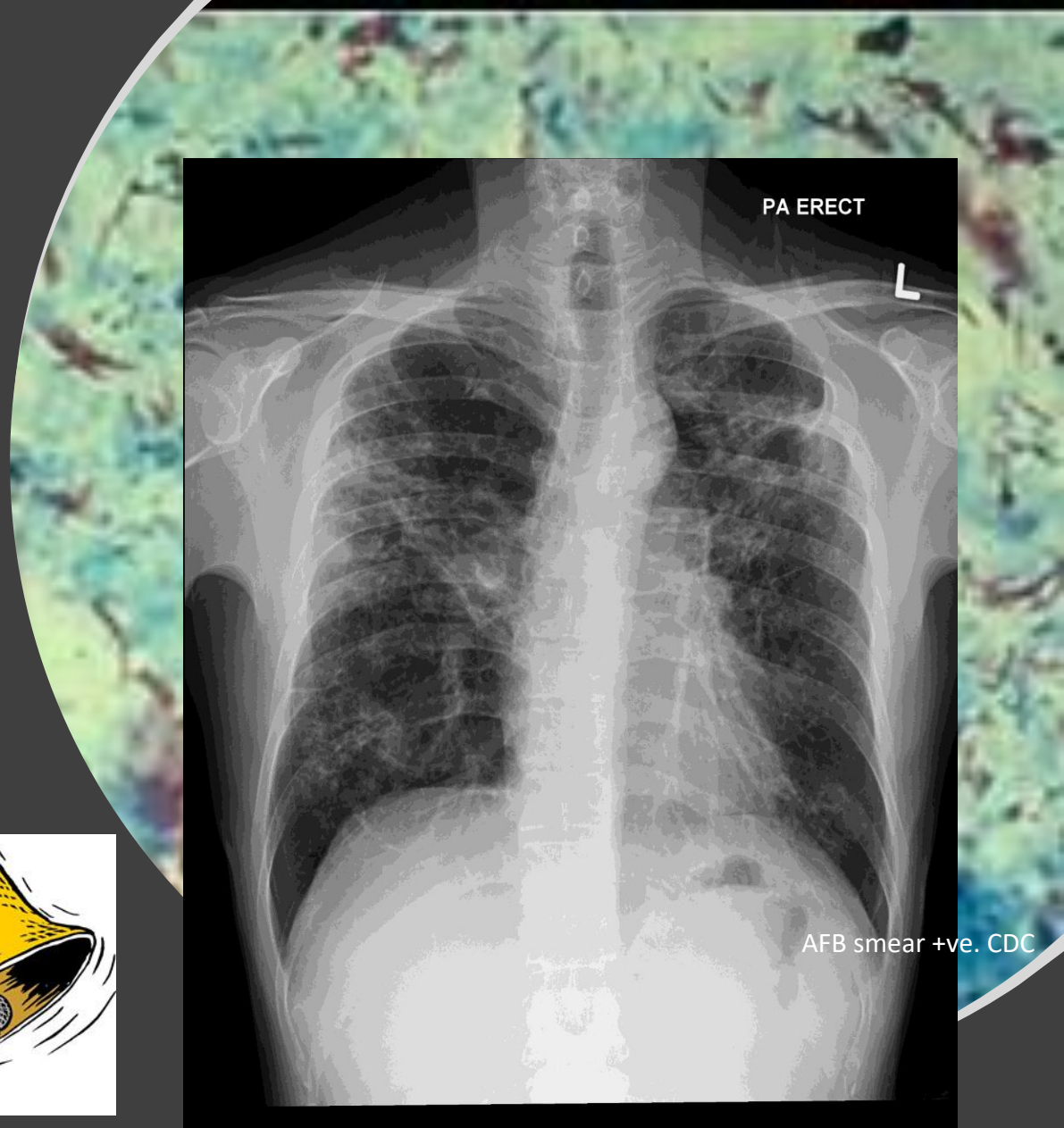
- 1 → 7/2020 RLEZ. 体重44.5 → 51kg.

- CXR也慢慢好转

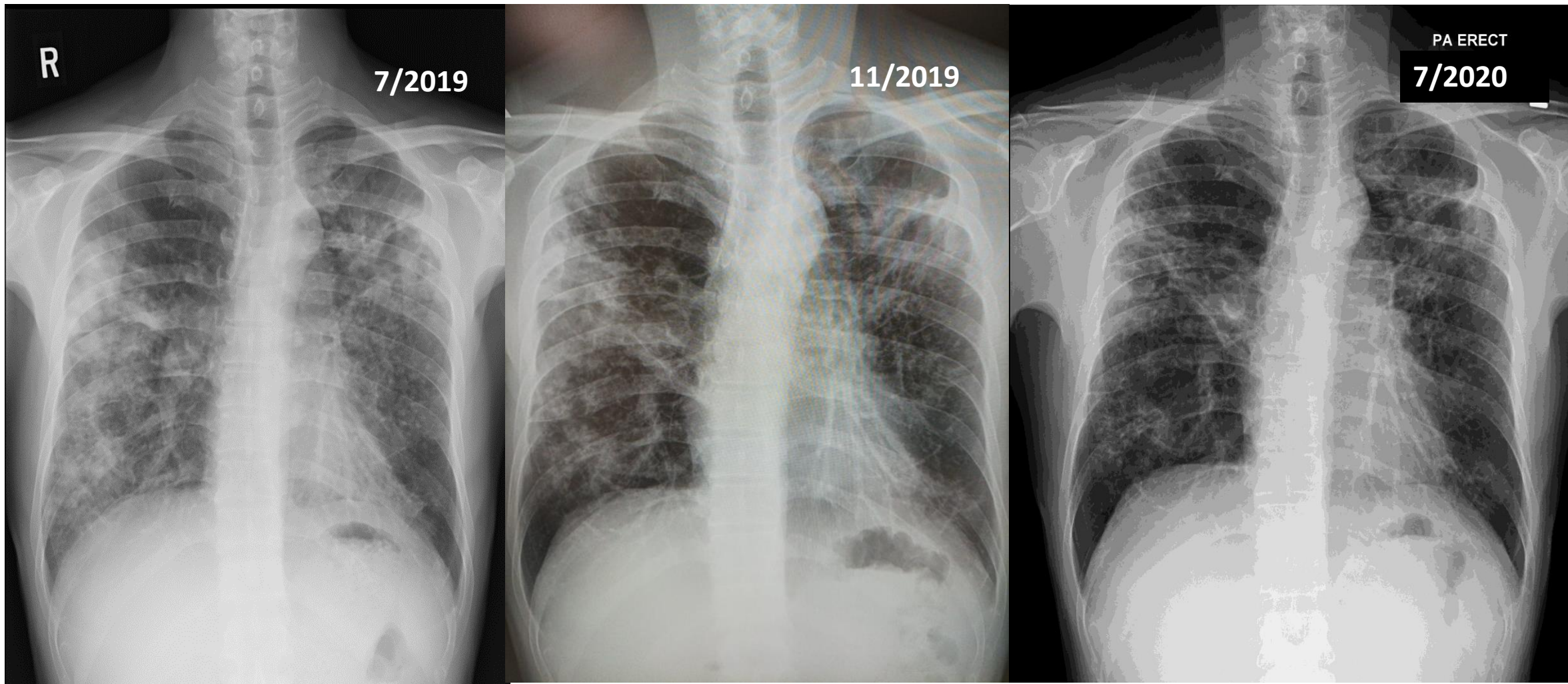
- 7/2020七个月RLEZ, 痰涎卻再次塗阳!

- 再次Hain检测: rpoB 仍然阴性. 但gyrA转阳!

- 药敏报告: 左氧氟沙星耐药!



7/2020



7/2019

12/2019

1/2020

7/2020

药物组合

异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺

异烟肼、利福平、
乙胺丁醇

利福平、左氧氟沙星、乙胺丁醇、
吡嗪酰胺

药敏

没对一线药物耐药

{耐}异烟肼

{耐}左氧氟沙星

Specimen Type: Sputum
 Sample Arrival Date: 20/07/2020
 Report Date: 04/08/2020

Molecular Drug Susceptibility Result of *M. tuberculosis*

Drug	Sequencing Result		
	Gene	Mutation	Interpretation*
Rifampicin	<i>rpoB</i>	I572F	Resistant
Isoniazid	<i>katG</i>	WT	Resistant
	<i>inhA</i> promoter region	C-15T	
	<i>inhA</i> structural gene	I194T	
	<i>furA-inhA</i>	WT	
Ethambutol	<i>embB</i>	D354A [#]	Mutation Detected
	<i>ubiA</i>	WT	
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	D63G	Resistant
	<i>rpsA</i>	WT	
Fluoroquinolones	<i>gyrA</i>	D94A	Resistant
	<i>gyrB</i>	WT	
Capreomycin	<i>tylA</i>	WT	WT
Linezolid	<i>rplC</i>	WT	WT
	<i>rrl</i>	WT	
Aminoglycosides	<i>rpsL</i>	K88R	WT: Kanamycin, Amikacin Resistant: Streptomycin
	<i>rrs</i>	WT	
	<i>eis</i>	WT	

Footnote:

*WT= Wild-type. No known mutation associated with drug resistance.
[#] Association of *embB* D354A mutation with ethambutol resistance remains unclear. Ethambutol genotypic resistance result of this report should be confirmed by PHLC drug susceptibility test.

This report is intended for **RESEARCH USE ONLY.**

Dr W.C. Yam

基因测序結果

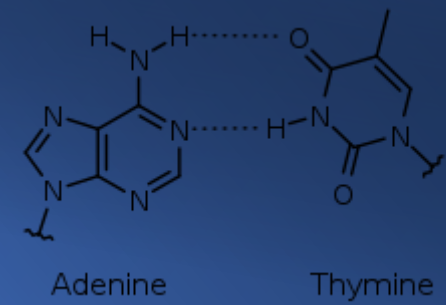
样本: 痰

日期: 20/7/2020

测序結果

药物	基因	变异	解释
利福平	<i>rpoB</i>	I573F	Resistant
异烟肼	<i>katG</i>	WT	Resistant
	<i>inhA</i> promoter region	G15T	
	<i>inhA</i> Structural gene	I194T	
乙胺丁醇	<i>embB</i>	D354A	
吡嗪酰胺	<i>pncA</i>	D63G	Resistant
左氧氟沙星	<i>gyrA</i>	D94A	Resistant
	<i>gyrB</i>	WT	
氨基糖苷类	<i>rrs, eis</i>	WT	
利奈唑胺	<i>rplC, rrl</i>	WT	

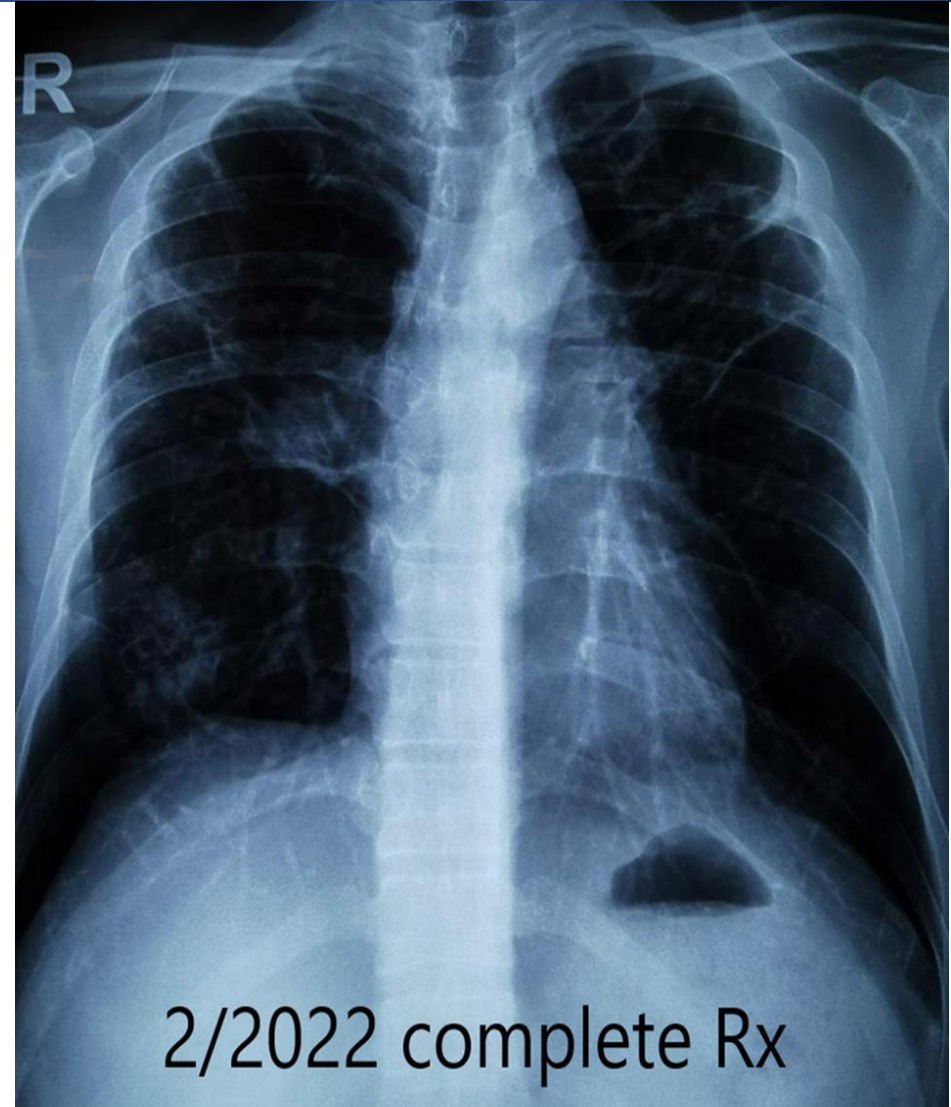
总结



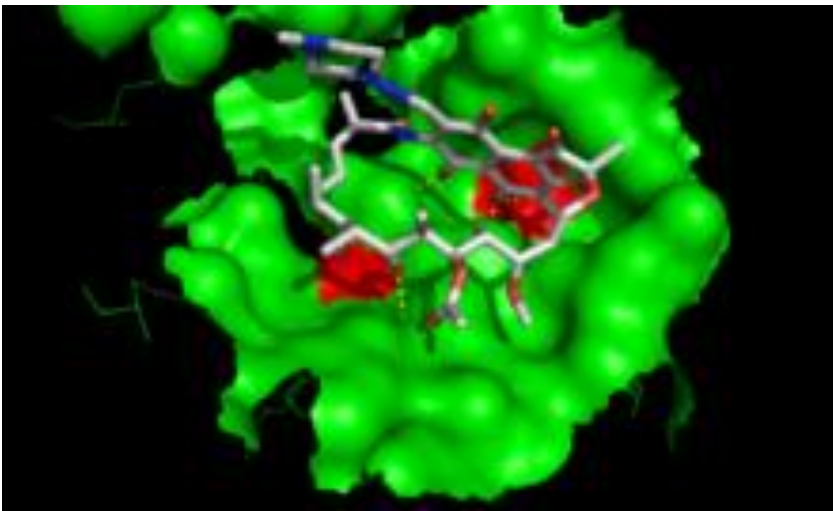
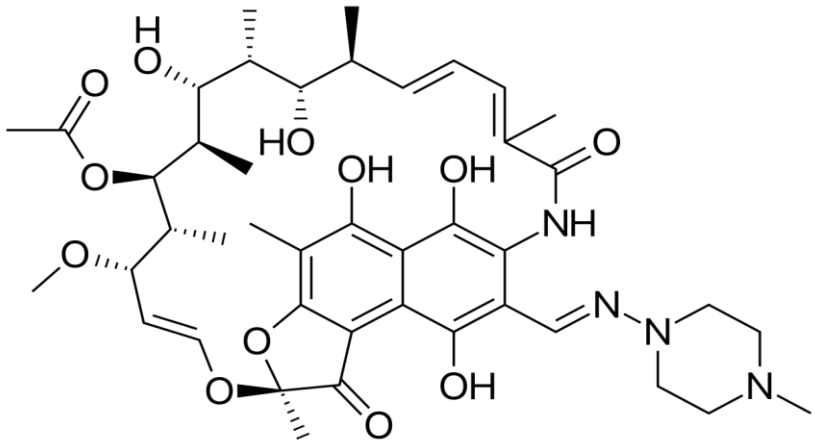
- 从利福平单一耐药[Rifampin mono-resistance] 在治疗过程中相继发展成异烟肼然后左氧氟沙星的前广泛耐药[pre-XDR]。
- **30/7/2021** 贝达奎林Bdq, 利奈唑胺Lzd, 环丝氨酸Cs, 氟法齐明Cfz & 阿米卡星Amk (WHO 2A2B1C) 组合治疗。

Progress after 2nd line drugs

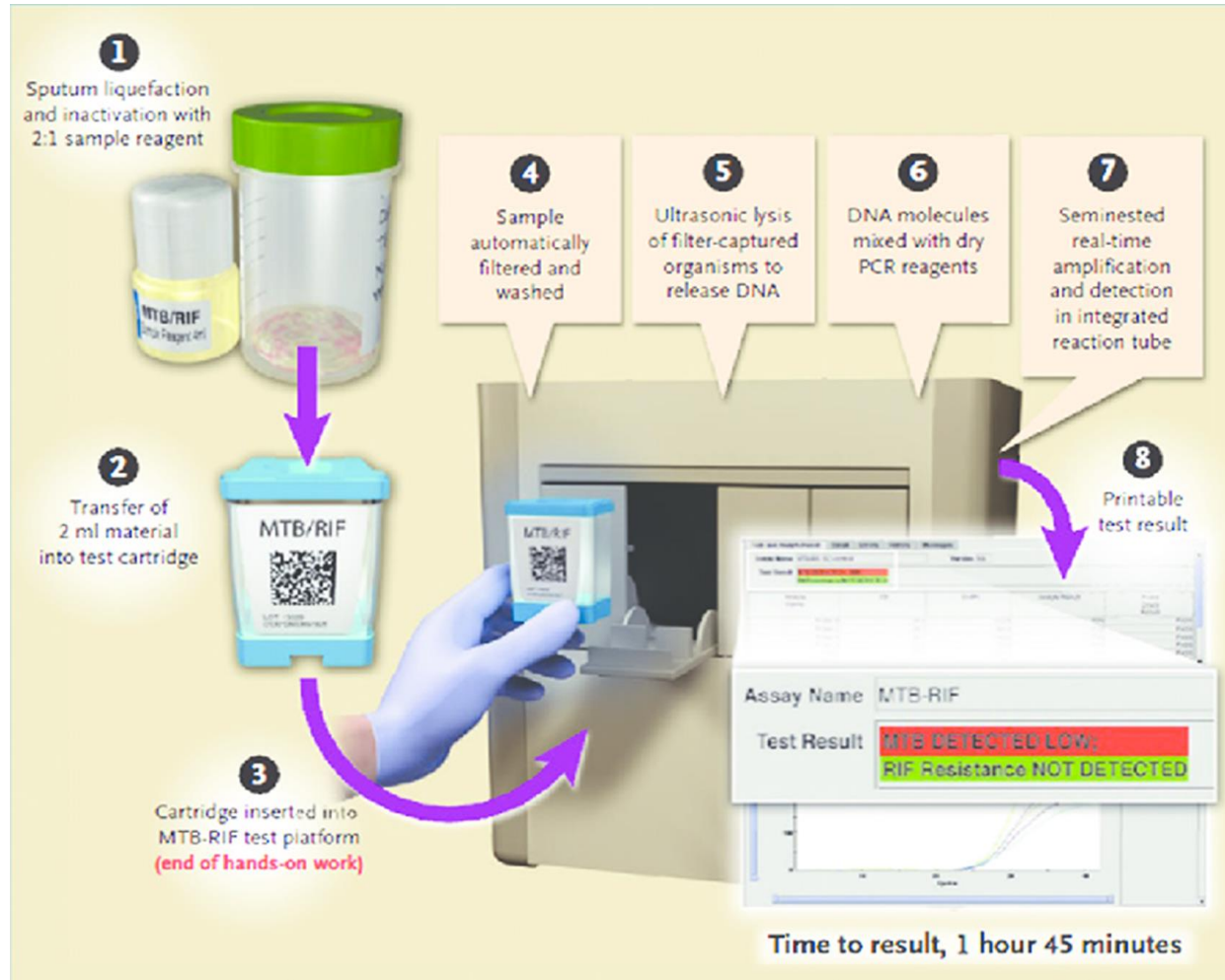
- 9/2020 二线药物治疗两个月, 痰涂阳减少。
- 10/2020 二线药物治疗三个月, 虽然左上肺空洞轻微增大, 痰持续涂阴。鉴别诊断: 成功治疗的相反反应。
- 当时将近完成四个月阿米卡星, 所以加特拉马尼 Dlm 去加强治疗。
- 完成24週贝述奎林以后, 继续以 Lzd, Cs, Cfz Dlm 治疗. 偶尔心电图 \uparrow QTc 517ms, 只需停药几天就恢复正常。
- CXR 持续进步, 痰培养也持续转阴。
- 最终完成18个月疗程。
-



Rifampin resistance 利福平耐药



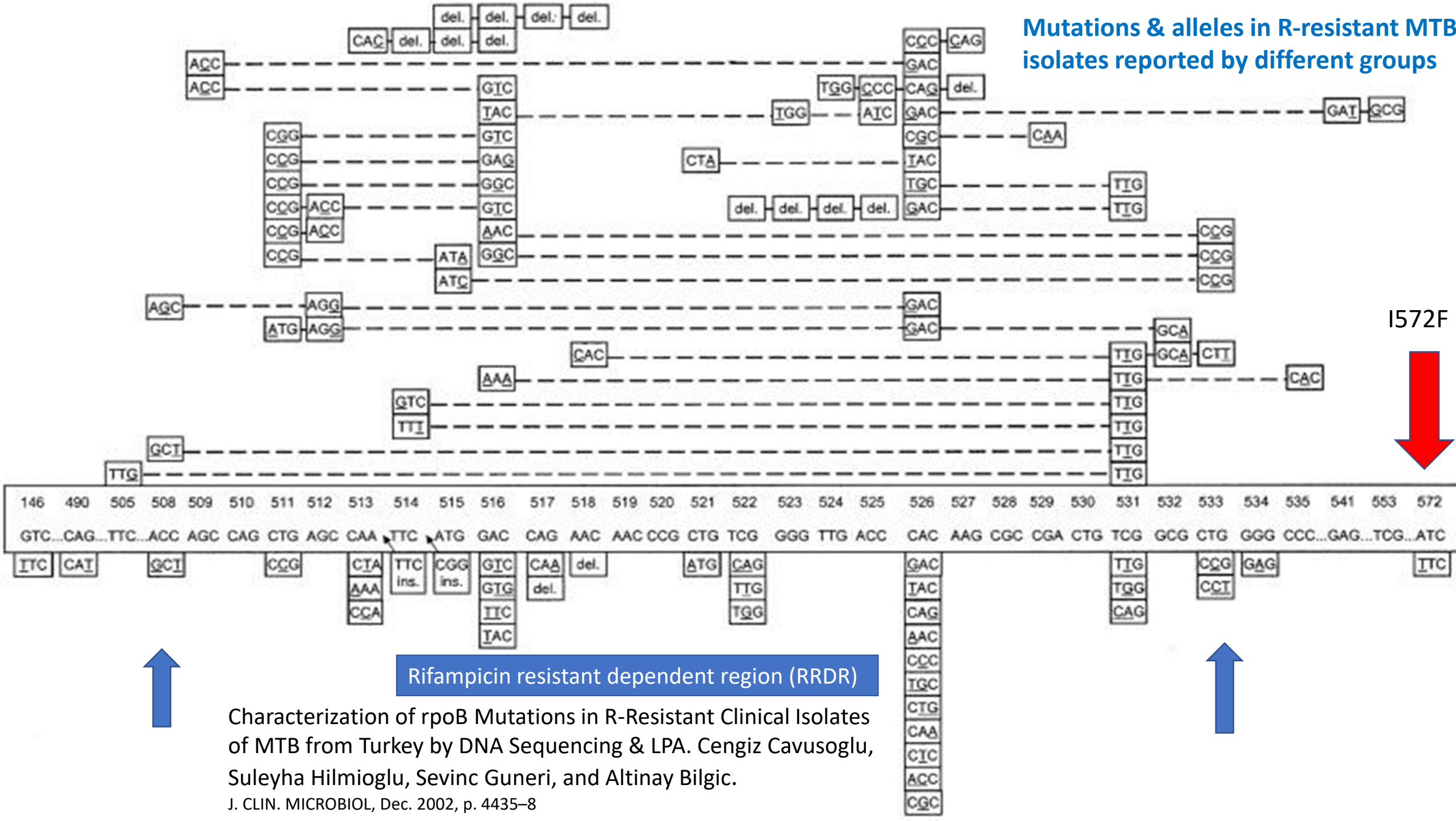
- 利福平药物的机制是靶向RNA聚合酶 β -亚基. 影响蛋白质制造. 导致杆菌死亡。
- 1993 A Telenti: RNA聚合酶 β -亚基基因[*rpoB*]的变异就是利福平耐药的机制. 当基因发生一点的变异, 就能影响跟药物粘合, 导致耐药。
- 96% *rpoB*变异发生在这基因的利福平耐药决定区域Rifampin Resistance Determining Region RRDR
- 这位于按大肠杆菌类似基因位置编号507-533的区域代表组成RNA聚合酶 β -亚基的27个氨基酸肽链的81bp碱基对。



- 针对不同RRDR变异
- 全自动Xpert MTB/RIF
- 95%敏感性, 98%特异性
- 两小时完成
- 定点照护检验

2014 Cochrane review

Mutations & alleles in R-resistant MTB isolates reported by different groups



Rifampicin resistant dependent region (RRDR)

Characterization of *rpoB* Mutations in R-Resistant Clinical Isolates of MTB from Turkey by DNA Sequencing & LPA. Cengiz Cavusoglu, Suleyha Hilmioglu, Sevinc Guneri, and Altinay Bilgic.

J. CLIN. MICROBIOL, Dec. 2002, p. 4435–8

- **RRDR [507-533]以外的变异不常见**
 - e.g 146 (Val146Phe), 176 (Val176Phe), 381 (Ala381Val), 490 (Gln490His), 500 (Ala500Val), 502 (Ile502Val), 505 (Phe505Ser), 538 (Leu538Phe) & **572 (Ile572Phe)**.

II572F / I491F变异

- 按大肠杆菌基因位置编号572位置編號等於結核杆菌相同基因位置編號491。
- 就在这位置发生ATC变TTC的单点变异把异亮氨酸Ile/I变成苯丙氨酸Phe/F。

Mutations outside the rifampicin resistance-determining region RRDR associated with rifampicin resistance in *M. tuberculosis*

Gilman Kit Hang Siu, Ying Zhang, Terrence C. K. Lau, Ricky W. T. Lau, Pak-Leung Ho, Wing-Wai Yew, Stephen K. W. Tsui, Vincent C. C. Cheng, Kwok-Yung Yuen, Wing-Cheong Yam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011 Apr;66(4):730-3.



- Sanger 基因测序方法, cloning & transform 改造 *M. smegmatis* & MTB
- MTB transformant harboring *rpoB* I572F mutation conferred (low level) rifampicin resistance phenotypes [MIC 8-16mg/L].
 - 因为这种变异发生在RRDR以外不远的地方，所以可以把它包含在同一测序当中而不用增加太多额外的时间和费用
 - NOT detected by phenotypic DST
- MTB transformant harboring *rpoB* V146F mutation conferred (high level) rifampicin resistance phenotypes [MIC 64mg/L].
 - Since position 146 is located at the N-terminal end of the *rpoB* gene which is too far away to be covered by RRDR PCR sequencing, it has to be detected separately.
 - 由於有效高的耐藥性，所以不難用傳統藥敏測試出
 - Commercially available rapid test can't detect these mutations. They are also rare. Future studies are needed to determine the usefulness of including these in early molecular detection of RR/MDR-TB.

Concern of I572F mutant at Drug Susceptibility Test DST (in MGIT) 2021 WHO技术报告 Technical Report on critical concentrations for DST of INAH & Rifamycins

- *I572F*变种导致低程度耐药, 加上慢生长的特征. 让它很容易更逃过用培养方式进行的传统药敏测试。因此在没有及时发现这情况下就导致更多耐药的發展。
- 虽然建议调低利福平敏测试的关键浓度到0.5mg/L. 但始终大部份 (>80%) 这变种仍然能逃过测试, 而延长培养也不太可行。
- 因此用基因方法进行药敏测试仍然是最好的标准。

I572F变异的发生率

- **Results of the 2nd national anti-TB drug resistance survey (2017/18).**

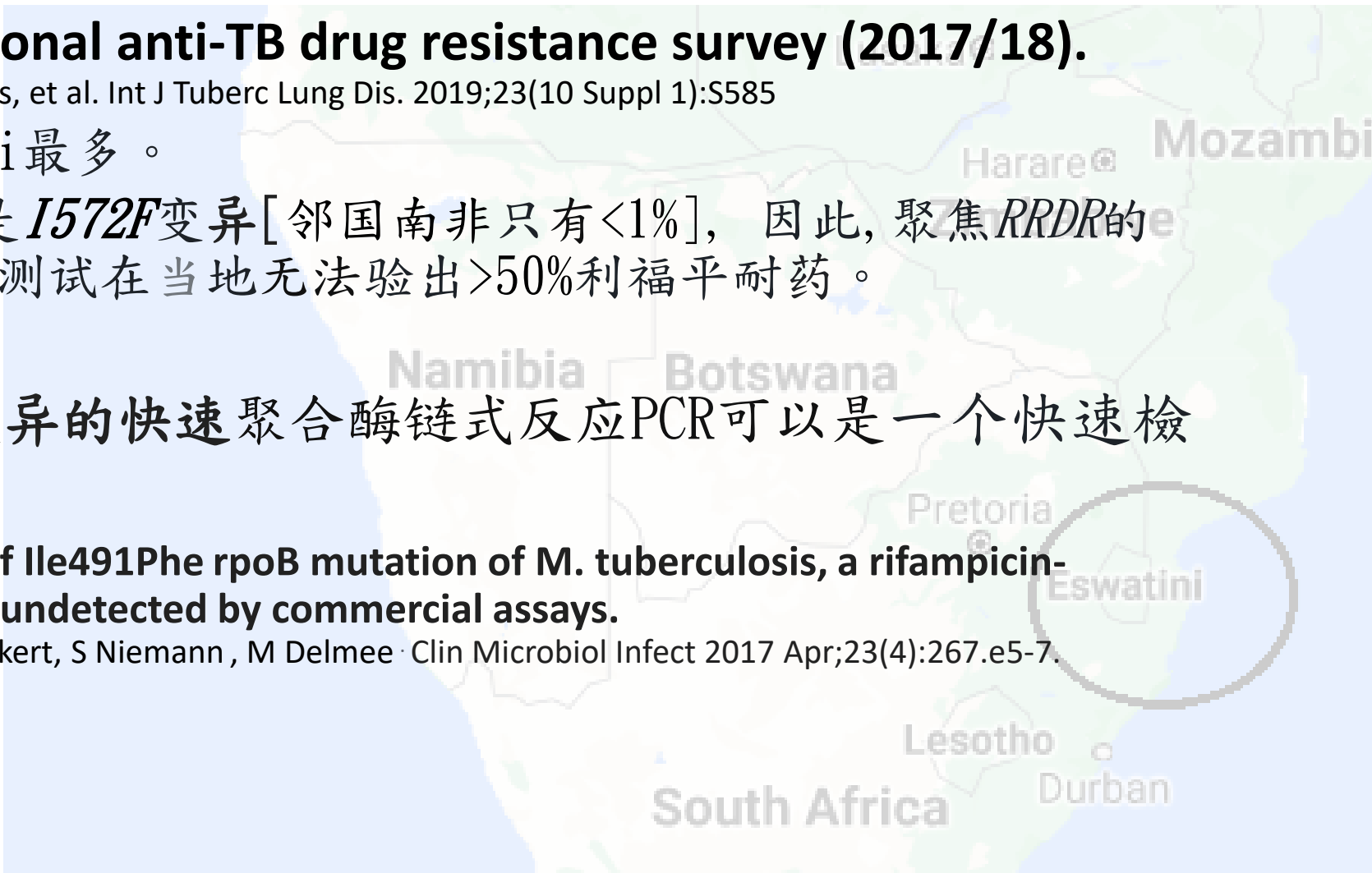
Sikhondze W, Dlamini T, Joloba Moses, et al. Int J Tuberc Lung Dis. 2019;23(10 Suppl 1):S585

- 以史瓦帝尼Eswatini最多。
- 占>50%利福平耐药是 *I572F* 变异[邻国南非只有<1%]，因此，聚焦RRDR的 Xpert MTB/RIF快速测试在当地无法验出>50%利福平耐药。

- 因此在当地针对这变异的快速聚合酶链式反应PCR可以是一个快速检测方法。

Novel rapid PCR for detection of Ile491Phe rpoB mutation of *M. tuberculosis*, a rifampicin-resistance-conferring mutation undetected by commercial assays.

E André, L Goeminne, A Colmant, P Beckert, S Niemann, M Delmee · Clin Microbiol Infect 2017 Apr;23(4):267.e5-7.



2022 香港结核病申报数据 <https://www.chp.gov.hk/en/statistics/data/10/26/43/7026.html>

年齡				(发病率, 每十万人人口)		
	男	女	总数	男	女	总数
0 - 4	2	0	2	1.85	0.00	0.95
5 - 9	0	0	0	0.00	0.00	0.00
10 - 14	3	6	9	1.99	4.29	3.10
15 - 19	17	26	43	12.82	20.41	16.54
20 - 24	31	44	75	21.12	30.70	25.85
25 - 29	38	57	95	18.46	25.10	21.94
30 - 34	45	87	132	20.00	30.46	25.85
35 - 39	50	99	149	21.99	29.70	26.57
40 - 44	57	82	139	24.35	23.47	23.82
45 - 49	78	81	159	33.33	24.53	28.18
50 - 54	115	79	194	47.52	23.90	33.88
55 - 59	151	95	246	56.11	28.57	40.89
60 - 64	248	96	344	82.36	29.87	55.26
65 - 69	285	91	376	113.32	34.17	72.61
70 - 74	248	91	339	130.12	45.50	86.79
75 - 79	216	62	278	203.39	54.77	126.71
80 - 84	186	47	233	240.93	57.25	146.26
85 & over	277	127	404	314.42	87.65	173.39
总数	2 047	1 170	3 217	61.48	29.53	44.12

2022耐药申报数据

<https://www.chp.gov.hk/en/statistics/data/10/641/695/4844.html>

- | | | | |
|----------------------|------|--------|--------------------|
| • 没有HRES耐药 | 2696 | 88.3% | |
| • 纯单一耐药 | | | |
| • 异烟肼 | 73 | 2.4% | |
| • 利福平 | 6 | (0.2%) | |
| • 任何(包含多重H+R)耐药 | | | |
| • 异烟肼 | 183 | 6% | [非多重:6%-0.8%=5.2%] |
| • 利福平 | 30 | | |
| • 多重 (H+R, 但不包含广泛)耐药 | 24 | 0.8% | |
| • 广泛耐药 | 0 | | |
- 香港在2011-20共350例多重耐药性结核当中只有5例[~1.5%]是I572F变异。

该种容易被忽略的变异可以导致其他药物耐药，尤以导致喹诺酮耐药的影响最严重

注意

异烟肼耐药(HK~5%)的治疗: RLEZ

- 治疗过程中一般容易發展出其他耐药, 复发率也效高
- WHO: 修正抗痲药组合治疗之前有需要用快速基因方法排除多重耐药, 推荐快速检测 Xpert/LPA, 但这些都只能检测位于RRDR的变异

不能同时使用利福平和异烟肼的治疗组合
需要使用喹诺酮并一线药物的治疗组合



THE USE OF MOLECULAR LINE PROBE ASSAY FOR THE DETECTION OF
RESISTANCE TO SECOND-LINE ANTI-TUBERCULOSIS DRUGS

ORIGINAL ARTICLE

Four-Month Rifapentine Regimens with or without Moxifloxacin for Tuberculosis

S.E. Dorman, P. Nahid, E.V. Kurbatova, P.P.J. Phillips, K. Bryant, K.E. Dooley, M. Engle, S.V. Goldberg, H.T.T. Phan, J. Hakim, J.L. Johnson, M. Lourens, N.A. Martinson, G. Muzanyi, K. Narunsky, S. Nerette, N.V. Nguyen, T.H. Pham, S. Pierre, A.E. Purfield, W. Samaneka, R.M. Savic, I. Sanne, N.A. Scott, J. Sherje, E. Sizemore, A. Vernon, Z. Waja, M. Weiner, S. Swindells, and R.E. Chaisson, for the AIDS Clinical Trials Group and the Tuberculosis Trials Consortium

N Engl J Med. 2021 May 6;384(18):1705-1718.

异烟肼、吡嗪酰胺、利福喷丁、莫西沙星併成现时最短的疗程

但喹诺酮始终是重要的二线药物,因此在广泛使用这种组合时,也需要排除包括 *I572F* 的 *rpoβ* 变异吗?

Treatment of drug-susceptible tuberculosis:
rapid communication

June 2021



基因测序的重要

- 基因测序可同时检验出包括对一线和二线药物的耐药性。广泛使用可大大提高药敏测试的效率，帮助及早精准治疗。
- 因此基因测序已经是现代测试的趋势。
- 只是在本地而言，是否要常规地包含这种**I572F**变异的测试还需要进一步探讨。

信息

- 密切观察病情/治疗进展
- 谨慎分析快速基因检测报告
- 了解快速/定点测试和快速培养/药敏的局限
- 考虑RRDR以外发生变异的可能性
- I572F变异生长较慢和低程度耐药的特征也帮它逃过快速培养和药敏测试
- 适当运用基因测序

鸣谢

- 香港大学微生物系任永昌博士暨团队
- 香港卫生署胸肺诊所
- 香港卫生署公共卫生化验中心

参考文献

- Siu GK, Zhang Y, Lau TC, et al. Mutations outside the rifampicin resistance-determining region associated with rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:730-3.
- ACK Chan, MCH Chan, PCW Yip, WC Yam, CH Chau, RFM Lam, LB Tai, CC Leung. Grave impact of undetected *rpoB* I572F mutation on clinical course of multidrug-resistant tuberculosis: a case report. *Hong Kong Med J* 2023;29:70–2
- **Results of the 2nd national anti-TB drug resistance survey (2017/18).**
Sikhondze W, Dlamini T, Joloba Moses, et al. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2019;23(10 Suppl 1):S585
- 2021 WHO Technical Report on critical concentrations for DST of INAH & Rifamycins
- **Novel rapid PCR for detection of Ile491Phe *rpoB* mutation of *M. tuberculosis*, a rifampicin-resistance-conferring mutation undetected by commercial assays.**
E André, L Goeminne, A Colmant, P Beckert, S Niemann, M Delmee. *Clin Microbiol Infect* 2017 Apr;23(4):267.e5-7.