DOI:10.16016/j.1000-5404.201603012

新基因 MTB73 与儿童结核病耐药相关性的初步研究

苏 薇,黄延风,郑改焕,朱朝敏,郭 倩 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院感染科,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室)

[**摘要**] **目的** 通过检测儿童结核感染临床分离株的耐药表型及其 MTB73 基因的表达,探讨该基因与结核耐药性的关系。**方法** 110 株儿童结核病临床分离株通过药敏实验分为耐药组和敏感组两个组,应用 RT-PCR 和基因测序的方法检测并验证结核分离株中新基因 MTB73 的表达,应用定量 PCR 检测基因 MTB73 在菌株中的表达量,比较耐药组菌株和敏感组菌株中 MTB73 基因阳性表达率和表达量的差异。**结果** 110 例临床结核分离株样本中 MTB73 基因阳性表达率为 11.82%(13 株)。经比较,耐药结核菌中 MTB73 阳性表达率及相对表达量均明显高于敏感菌株($\chi^2=6.014$,$P=0.014$;$t'=8.075$,$P<0.001$)。根据耐药种数不同,将耐药菌株分为耐单药(32 株)、多耐药(12 株)和耐多药(14 株)3 个亚组,其中耐多药组的 MTB73 阳性表达率(9 株,64.29%)明显高于单耐药组(1 株,3.13%)、多耐药组(1 株,8.33%)及敏感组(2 株,3.85%),差异有统计学意义($\chi^2=17.969$,$P<0.001$;$P=0.005$;$\chi^2=24.823$,$P<0.001$)。单耐药组、多耐药组及敏感组 3 个组中 MTB73 基因阳性表达率两两之间比较差异无统计学意义($P>0.008$)。**结论** MTB73 基因在耐药菌株尤其是耐多药菌株中高表达,提示新基因 MTB73 可能与儿童耐药结核病的耐药性相关。

[**关键词**] 结核分枝杆菌;新基因 MTB73;聚合酶链反应;耐药性
[**中图法分类号**] R372;R725.2;R915 [**文献标志码**] A

Preliminary study on the correlation of gene MTB73 with drug resistant tuberculosis in children

Su Wei, Huang Yanfeng, Zheng Gaihuan, Zhu Chaomin, Guo Qian (Department of Infectious Diseases, Key Laboratory of Children Development of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the correlation of gene MTB73 to drug resistant tuberculosis (TB) in children by measuring MTB73 mRNA expression in isolated strains of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistant isolates. **Methods** A total of 110 clinical isolates of children with TB were divided into resistant group and sensitive group by drug susceptibility test. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and gene sequencing techniques were used to detect and verify MTB73 gene expression in the 110 clinical isolates. The expression level of MTB73 was quantified using SYBR Green I real-time PCR and the differences of the expression between these 2 groups were analyzed. **Results** Of 110 clinical isolates, 11.82% (13 isolates) were MTB73 expressed. The expression rate and level of MTB73 were significantly higher in drug resistant isolates than in drug sensitive isolates, with statistical significance (*Chi* square = 6.014, $P=0.014$; $t'=8.075$, $P<0.001$). The drug resistant isolates were further divided into 3 subgroups: single drug-resistance ($n=32$), polyresistance ($n=12$) and multidrug resistance ($n=14$). The expression

[**基金项目**] 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研计划基金(20142047)
[**通信作者**] 黄延风,E-mail:ymhykq@126.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160504.0935.008.html(2016-05-04)

rate of MTB73 in multidrug resistant isolates(9,64.29%) was significantly higher than in single drug-resistant group(1,3.13%), polyresistant group(1,8.33%) and drug sensitive group(2,3.85%), with a statistically significant difference (*Chi* square = 17.969, $P < 0.001$; $P = 0.005$; *Chi* square = 24.823, $P < 0.001$). Additionally, MTB73 expression was not significantly different among the single drug-resistant, polyresistant and drug sensitive groups ($P > 0.008$). **Conclusion** Gene MTB73 is significantly upregulated in resistant isolates, especially in multidrug resistant isolates, suggesting that MTB73 may be associated with drug resistance of children TB.

[**Key words**] *mycobacterium tuberculosis*; MTB73 gene; polymerase chain reaction; drug resistance

Supported by the Medical Scientific Research Foundation of Chongqing Health and Family Planning Commission (20142047). Corresponding author: Huang Yanfeng, E-mail: ymhykq@126.com

据 WHO 报道,2013 年全球约有 900 万新增结核病例,并有 150 万人死于结核病[1]。结核病发病率和病死率居高不下的一个重要原因是耐药结核病尤其是耐多药(MDR-TB)流行和传播。耐药结核病由于其长疗程、高费用、低治愈率、高死亡率等特点,给结核病的防控带来前所未有的挑战[2]。近年来,儿童耐药也逐渐引起人们的重视,据估计,儿童 MDR-TB 病例约占全球总耐多药患者的 15%[3]。我国是全球结核病高负担国家,也是耐药结核病的高发地区,据估计我国每年新发 MDR-TB 约占全球每年新发 MDR-TB 的 1/4,耐多药率几乎达到世界平均水平的 2 倍[4]。深入研究耐药结核菌产生的分子机制,寻找逆转结核菌耐药尤其是耐多药途径,已成为结核病防治面临的重要任务。本课题组在前期研究中通过抑制消减杂交技术,对耐多药结核菌与敏感结核菌差异表达的基因进行筛选,发现耐多药结核菌中差异表达的未知新基因序列,命名为 MTB73[5]。在此基础上,本实验通过检测 MTB73 基因在 110 例临床儿童结核分离株中的表达,进一步验证新基因 MTB73 并深入探讨其与儿童耐药结核病有无相关性。

1 资料与方法

1.1 标本来源

实验抽取的样本包含 168 株临床结核分枝杆菌菌株,均来源于重庆医科大学附属儿童医院感染科收集的从 2008 年 2 月至 2014 年 10 月住院结核病儿童的体液标本。除外保存菌株中复苏失败及药敏实验中污染的菌株,实际得到有效药敏实验结果为 110 株。所得菌株的标本来源:痰胃液(67 例),脑脊液(23 例),支气管灌洗液(5 例),胸水(9 例),穿刺液(2 例),腹水(2 例),脓液(1 例),尿液(1 例)。其中每个标本对应 1 个患儿。

1.2 菌种鉴定及药敏实验

标本的收集、处理、培养、菌种初步鉴定和药物敏感实验均严格遵守《结核病诊断实验室检验规程》的规定操作。采用改良罗氏培养基作为中性对照,菌种初步鉴定采用对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基生长实验。所有确定为结核分枝杆菌均进行常规药敏实验,药敏实验按照《肺结核诊断与治疗指南》的判定标准,采用 WHO 推荐的比例法进行,4 种一线抗结核药物是异烟肼(isoniazide,INH)、利福平(rifampicin,RFP)、链霉素(streptomytin,SM)和乙胺丁醇(ethambutol,EMB),药物在培养基中最终浓度分别为 0.2、40.0、4.0、2.0 μg/mL。以上所用培养基均有试剂厂家提供。根据药敏结果将 110 例菌株分为耐药组和敏感组两个组。根据耐抗结核药物的种数,且按照《耐药结核病规划管理指南》标准[6]的相关定义,将耐药结核菌株细分为单耐药(结核病患者感染的结核杆菌体外被证实对一种一线药物抗结核药物耐药)、多耐药(结核病患者感染的结核杆菌体外被证实对不同时包括异烟肼、利福平在内的一种以上的一线抗结核药物耐药)和耐多药(结核病患者感染的结核杆菌体外被证实至少对异烟肼、利福平耐药)3 个亚组。

1.3 引物合成

根据文献[5]中获得的 MTB73 基因的 DNA 序列及内参照基因 sig A 的序列分别设计引物(表 1),引物由 ABI 公司的 Primer Express Software v2.0 设计,由华大基因公司合成。

1.4 RT-PCR

1.4.1 总 RNA 的提取 离心菌液,吸尽上清,加液氮充分研磨,在菌体中加 1 mL TRIzol 试剂,按说明书进行操作提取总 RNA。-80 ℃冻存。用紫外分光光度仪测 $D(260)/D(280)$ 的比值,并定量。通过 1.5% 的凝胶电泳检测其完整性。

表1 新基因 MTB 73 及内参基因 sig A 的引物序列与长度

基因	引物序列(5′→3′)	扩增产物长度(bp)
MTB73	上游引物:ATCGCCAGTTAAAAGCGAT	228
	下游引物:CTTCCCAGCGAAAAGTATGC	
sig A	上游引物:TCGAGGTGATCAACAAGCTG	254
	下游引物:CTGCAGCAAAGTGAAGGACA	

1.4.2 cDNA 合成及 PCR 扩增

1.4.2.1 逆转录反应体系及反应条件 以提取的总 RNA 为模板,按照反应体系:DEPC 水 6 μL,RNA 酶抑制剂(50 U/μL)0.5 μL,随机引物(50 pmol/μL)2 μL,RNA 2 μL。混匀后,65 ℃水浴5 min,室温放置 10 min。高速离心 5 s。向上述离心管中加入反应物:RNA 酶抑制剂(50 U/μL) 0.5 μL,5 × buffer 4 μL,dNTP MIX 2 μL,DTT 2 μL,AMV(200 U/μL) 1 μL。混匀后,40 ℃逆转录 60 min,90 ℃ AMV 失活 5 ~ 10 min,冷却 5 min,高速离心 5 s。-20 ℃冰箱保存反转录产物。

1.4.2.2 PCR 反应体系及反应条件 以反转录的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,配制反应体系(共 25 μL):premix 12.5 μL,上、下游引物各 1.0 μL,模板 1.0 μL,H_2O 9.5 μL。反应条件:94 ℃预变性 3 min,98 ℃变性 10 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,72 ℃最后延伸 5 min,共 35 个循环。

1.5 PCR 产物分析

取 PCR 产物 5 μL 在 2.0% 的琼脂糖凝胶中电泳,120V 电泳 35 min,阳性结果可见 228 bp 与 254 bp 处各有 1 条亮带,分别为 MTB73 和 sig A。用紫外投射仪观察并用粘胶成像仪照相。

1.6 基因测序

MTB73 基因阳性表达菌株确定 PCR 扩增条带与预期扩增产物大小一致后,取 20 μL 扩增成功的样本的 PCR 产物送往上海嘉根生物科技有限公司进行双向测序(ABI 3730 测序仪)。MTB73 基因测序引物同表1。测序结果运用 DNAMAN8 软件与 MTB73 报道的 DNA 序列进行比对。

1.7 实时定量 PCR 检测 MTB73 基因的表达量

根据设计的引物,参照 TaKaRa SYBR® Premix *Ex Taq*(Perfect Real-time)试剂盒标准操作步骤进行。反应条件为:95 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 10 s,59 ℃退火 10 s,72 ℃延伸 40 s,重复此循环 40 次,72 ℃最后延伸 5 min。采用 SYBR Green Ⅰ实时荧光定量 PCR 仪配套的 SDS 2.1 软件进行数据采集。每个 MTB73 阳性表达菌株均进行 3 次独立且重复的实验,最终 △Ct 值取 3 次的⊿Ct 值平均值。计算出每个样本对应的 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 值分析。在 2 株 MTB73 基因阳性表达药物敏感株中,选择 1 株菌株的目的基因表达量为 1,分别求出其余 MTB73 基因阳性表达菌株的相对表达量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计学分析。统计新基因 MTB73 在不同耐药组中阳性表达菌株数所占百分比。样本率比较采用卡方检验或者 Fisher 确切检验法,4 个组样本中 MTB73 基因阳性表达率比较以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,两两比较以 $P<0.008$ (0.05/6)为差异有统计学意义。耐药组和敏感组阳性表达菌株中 MTB73 的相对表达量的比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药敏实验结果

根据最终药敏实验结果(表 2),110 例临床结核分离株中耐药组菌株和敏感组菌株分别为 58 株和 52 株。其中 58 株耐药菌株中,耐单药菌株 32 例,多耐药菌株 12 例,耐多药菌株 14 例。

2.2 结核分枝杆菌 RNA 抽提结果

紫外分光检测 RNA 核酸 260 nm 和 280 nm 处的光密度值,测得 3 组结核菌株的 $D(260)/D(280)$ 比值均在 1.8 ~ 2.0 之间,排除蛋白质等杂质的污染。通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,RNA 条带均清晰明亮,无弥散拖尾现象,说明总 RNA 完整。

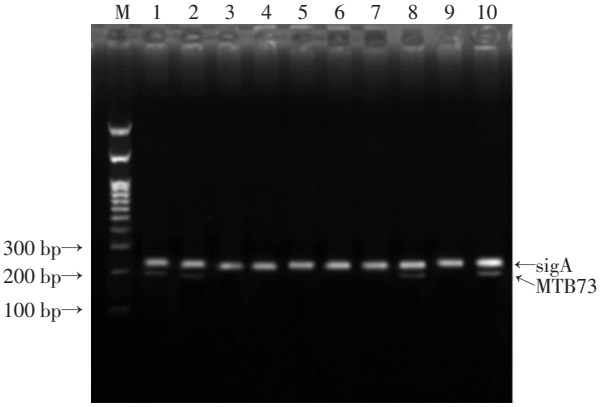
表2 结核分枝杆菌 58 株耐药结核菌株药敏实验结果

菌株	耐药种类	菌株编号	菌株数
单耐药组(32 株)	INH	51、65、101、107、143、239、362、363、381	9
	RFP	208	1
	SM	7、11、19、57、75、80、149、193、201、203、226、305、309、349	14
	EMB	79、108、122、139、198、206、213、219	8
多耐药组(12 株)	INH + SM	18、23、142、181、231、376	6
	SM + EMB	85、341、346	3
	INH + EMB	401	1
	INH + SM + EMB	40、385	2
耐多药组(14 株)	INH + RFP + SM	88、155	2
	INH + RFP + SM + EMB	13、47、98、147、168、185、292、293、374、390、461、500	12

INH:异烟肼;RFP:利福平;SM:链霉素;EMB:乙胺丁醇

2.3 MTB73 基因在临床结核分离株中的表达率比较

MTB73 及 sig A 基因 RT-PCR 扩增结果见图 1,在阳性表达菌株中包含两条亮带,分别代表 MTB73(228 bp)和 sig A(254 bp)。MTB73 基因在不同耐药菌株中表达情况见表 3、4。110 个临床样本中总共检测到 MTB73 的阳性表达菌株 13 例,其中包括耐多药株 9 例、单耐 INH 株 1 例、耐 INH + SEM 株 1 例及敏感株 2 例。



M:标准 100 bp Ladder;1、2、8、10:MTB73 基因阳性表达菌株(MTB73 DNA 片段长度 228 bp);3、4、6、7、9:MTB73 基因阴性表达菌株(内参基因 sig A 片段长度 254 bp);5:阴性对照;结核标准株 H37Rv

图 1 RT-PCR 检测结核分枝杆菌内 MTB73 基因的表达

2.3.1 MTB73 基因在耐药菌株与敏感菌株中表达差异性比较 在耐药菌株和敏感菌株中检测到新基因 MTB73 阳性表达菌株分别为 11 例和 2 例,且耐药菌株中 MTB73 阳性表达率(18.97%)明显高于敏感菌株(3.85%),差异有统计学意义($\chi^2 = 6.014$, $P = 0.014$)。

2.3.2 MTB73 基因在不同耐药表型菌株中阳性表达率的比较 在不同耐药性结核菌株中,以敏感菌株为对照进行比较分析。单耐药组、多耐药组、耐多药组及敏感组 4 个组中 MTB73 基因阳性表达率分别为 3.13%、8.33%、64.29% 和 3.85%。4 个组结核菌株中 MTB73 基因阳性表达率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 28.935$, $P < 0.001$);4 个组菌株中 MTB73 阳性表达率两两比较:耐多药组 MTB73 阳性表达率显著高于单耐药组、多耐药组、敏感组,差异有统计学意义($\chi^2 = 17.969$, $P < 0.001$; $P = 0.005$; $\chi^2 = 24.823$, $P < 0.001$);单耐药组、多耐药组、敏感组之间两两比较差异无统计学意义($P > 0.008$)。

2.4 MTB73 基因测序结果

对每个测序样本双向测序结果的拼接确保获得完整的 PCR 产物序列,比对结果发现 13 株 MTB73 基因阳性表达菌株的 PCR 产物序列显示与文献报道的 MTB73 基因序列完全吻合,证实扩增基因为 MTB73 基因。

2.5 MTB73 的相对表达量

基因 MTB73 和内参基因 sigA 的 PCR 产物溶解温度均一,未见明显的非特异扩增峰及引物二聚体峰,说明所有样本的目的基因都获得了特异性扩增。耐药组中 MTB73 基因的相对表达量为(2.079 ± 0.386),明显高于敏感组菌株的(1.060 ± 0.085),差异有统计学意义($P < 0.001$)。

3 讨论

结核病是严重危害人类健康的公共卫生问题,耐药结核病尤其是 MDR-TB 的流行和传播严重阻碍了结核病的防治工作。随着分子生物学诊断技术的进展,结核分枝杆菌的耐药机制逐渐被揭示。目前认为结核菌的耐药性主要是由于染色体上某些基因突变改变相应菌体内的药物作用靶点所致,rpsL、rpoB、katG、pncA、embB、inhA、gyrA 等基因突变是导致结核菌对 5 种一线抗结核药(利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、链霉素)产生耐药性的主要分子机制。但临床上仍有 5% ~35% 结核杆菌的耐药性机制不明,无法用已知的耐药基因突变来解释,提示结核菌的耐药性仍存在其他机制[7-9]。尤其是 MDR-TB 的耐药机制复杂,并不是单纯的耐单药基因作用的简单叠加所能阐明的。因此,要完全阐明结核的耐药本质,仍需要不断的探索研究。本课题组在前期研中选取 1 株耐异烟肼、利福平、链霉素 3 种药物的儿童 TB 临床结核分离株,建立基因文库,以结核菌标准株 H37Rv 为对照,从基因差异表达角度入手,筛选出差异表达的新基因 MTB73,并推测 MTB73 基因可能参与了儿童结核病的耐药机制。在此基础上,本研究希望进一步验证 MTB73 基因存在于结核菌株中,并且对 MTB73 基因的临床意义进行初步研究。

本研究在 110 例结核菌株中总共检测到 13 例(11.82%)MTB73 阳性表达菌株,说明 MTB73 基因在临床结核分枝杆菌分离株中存在表达,验证了本课题组前期的实验研究。在这 13 例 MTB73 阳性表达菌株中,耐药菌株 11 例(含 9 例耐多药株、1 例单耐 INH 株、1 例耐 INH + SEM 株),敏感菌株 2 例。统计学分析结果显示耐药菌株中 MTB73 阳性表达率明显高于敏感组菌株,提示 MTB73 基因的表达可能参与了结核菌耐药机制。将耐药菌株根据不同耐药表型细分为单耐药组、多耐药组及耐多药组 3 个亚组,其中耐多药菌株中 MTB73 阳性表达率最高,达 64.29%,明显高于

单耐药组(3.13%)、多耐药组(8.33%)及敏感组(3.85%),并且单耐药组、多耐药组及敏感组3个组中MTB73基因的阳性表达率两两比较无明显差异,提示MTB73基因的表达可能与MDR-TB的耐药性的相关性更加密切。结果还显示,耐药菌株中MTB73基因的相对表达量明显高于敏感组,差异有统计学意义,说明MTB73基因在耐药结核菌中存在高表达,进一步提示MTB73基因可能与结核菌的耐药性有关。

目前结核菌的耐药主要分为原发性耐药机制和获得性耐药机制[10]。获得性耐药机制是大多数结核耐药菌株产生耐药的主要分子机制,由已知的药物作用靶分子的编码基因突变导致结核菌的耐药。原发性耐药机制主要为分枝杆菌细胞壁的通透性障碍和外排泵机制,其中前者主要针对常见的非抗结核药物耐药,后者是目前结核菌耐药机制研究的热点,其耐药机制主要由于某些基因编码的外排泵蛋白通过主动外排结核分枝杆菌菌体内一种或者多种药物,降低胞内药物浓度使其无法达到有效抑菌浓度,最终产生药物耐受性[11-13]。目前国内外均少见对MTB73基因其功能研究进行相关报道。MTB37基因的同源性分析显示其与目前已知的基因序列均无明显相似性。虽然MTB73基因在耐药菌株中的高表达提示其与结核菌的耐药性可能相关,但是其功能及参与耐药的机制仍需深入探索。

综上所述,本研究通过检测新基因MTB73在临床结核菌分离株中的表达,验证了MTB73基因在结核分枝杆菌中的表达。从MTB73基因在耐药结核菌中的高表达可推测其与结核的耐药性可能存在密切关系。进一步通过分析MTB73基因在不同耐药表型的临床分离株中的表达,发现MTB73基因在MDR-TB菌株中阳性表达率明显高于其他耐药性菌株,推测MTB73基因可能与MDR-TB的耐药性更为密切。但是由于儿童结核病患者明显少于成人结核病患者,且TB患儿存在痰含菌量少、样本不易采集等问题,造成研究中儿童结核病临床分离株尤其是耐药结核分离株获得有限。因此,本研究仅对MTB73基因与结核耐药性的相关性做一个初步的预测,同时对MTB73基因的功能研究奠定基础。在以后的研究里,我们将扩大样本量更准确更全面地探讨MTB73与结核耐药性的关系,并对MTB73基因的功能进行深入研究,以期进一步揭示耐多药结核菌的基因表达特征及结核耐多药产生的基因调节机制,为抗结核新药的研制及结核病的防治工作奠定良好的实验基础。

参考文献:

[1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. WHO/HTM/TB/2014.08[R]. Geneva: World Health Organization, 2014: 1-171.

[2] Sotgiu G, Migliori G B. Facing multi-drug resistant tuberculosis[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2015, 32: 144-148. DOI: 10.1016/j.pupt.2014.04.006

[3] Ettehad D, Schaaf H S, Seddon J A, *et al*. Treatment outcomes for children with multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(6): 449-456. DOI:10.1016/S1473-3099(12)70033-6

[4] Zhao Y, Xu S, Wang L, *et al*. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med, 2012, 366(23): 2161-2170. DOI: 10.1056/NEJMoa1108789

[5] Zhang Y, Zheng G, Wang Y, *et al*. Screening and comparison of differentially expressed genes between one MDR-TB strain and the virulent M. tuberculosis H37Rv[J]. Gene, 2012, 506(1): 223-229. DOI:

[6] World Health Organization. 耐药结核病规划管理指南(2008紧急修订版)[M]. 中国疾病预防控制中心结核病防治临床中心,世界卫生组织结核病研究培训合作中心,中华医学会结核病学分会,译. 北京:中国疾病预防控制中心结核病防治临床中心,2008.

[7] 邓叶华, 向延根, 马小华, 等. 结核分枝杆菌耐利福平和异烟肼分子机制的研究进展[J]. 实用预防医学, 2015, 22(9): 1148-1151. DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2015.09.043

[8] World Health Organization. WHO global tuberculosis control report 2014[R]. Geneva: World Health Organization: 2015.

[9] 彭哲, 朱朝敏, 幸琳琳, 等. 结核分枝杆菌北京基因型菌株与重庆地区结核患儿耐药表型的相关分析[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(23): 2545-2548. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2010.23.022

[10] Almeida-da-Silva P E, Palomino J C. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(7): 1417-1430. DOI:10.1093/jac/dkr173

[11] Li G, Zhang J, Guo Q, *et al*. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0119013. DOI: 10.1371/journal.pone.0119013

[12] Bailo R, Bhatt A, Ainsa J A. Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its implications in virulence and drug development[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 96(3): 159-167. DOI: 10.1016/j.bcp.2015.05.001

[13] Koser C U, Javid B, Liddell K, *et al*. Drug-resistance mechanisms and tuberculosis drugs[J]. Lancet, 2015, 385(9965): 305-307. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)62450-8

(**收稿**:2016-03-02;**修回**:2016-04-21)

(编辑 张 维)