

• 论著 •

广西壮族自治区耐多药结核分枝杆菌耐药情况
与基因型特征分析

梁小烟 林玫 梁大斌 蓝如束 覃慧芳 叶婧 黄莉雯

【摘要】 目的 了解广西壮族自治区(简称“广西”)耐多药结核分枝杆菌(MDR-MTB)的耐药情况、基因型构成及基因型与耐药的相关性,为耐多药结核病的防控提供理论依据。**方法** 采用连续监测的方法,选取位于广西境内东、西、南、北、中的贵港、百色、崇左、桂林和防城港 5 个市为监测点,采用随机数字表法抽取 5 个市中的 21 个县(市、区),纳入于 2016—2017 年在当地结核病防治(简称“结防”)机构登记治疗且培养阳性的 MTB 菌株共 1514 株,使用 WHO 推荐的比例法对异烟肼(INH)、利福平(RFP)、乙胺丁醇(EMB)、链霉素(Sm)、氧氟沙星(Ofx)和卡那霉素(Km)进行耐药性检测,最终有 51 株确定为 MDR-MTB 菌株。运用熔解曲线间隔区寡核苷酸分型法(McSpoligotyping)对 MDR-MTB 菌株进行基因分型,将分型结果与 SpolDB4.0 数据库进行比对。**结果** 51 株 MDR-MTB 菌株对 EMB、Sm、Ofx 和 Km 的耐药率分别为 41.18%(21/51)、31.37%(16/51)、9.80%(5/51)和 1.96%(1/51)。北京基因型菌株占 56.86%(29/51),非北京基因型菌株占 43.14%(22/51)。对 EMB 耐药的菌株中,北京基因型 14 株,占 66.67%(14/21),非北京基因型 7 株,占 33.33%(7/21),差异无统计学意义($\chi^2=1.399$, $P=0.237$);对 Sm 耐药的菌株中,北京基因型 11 株,占 68.75%(11/16),非北京基因型 5 株,占 31.25%(5/16),差异无统计学意义($\chi^2=1.343$, $P=0.246$);对 Ofx 耐药的菌株中,北京基因型 9 株,占 60.00%(9/15),非北京基因型 6 株,占 40.00%(6/15),差异无统计学意义($\chi^2=0.085$, $P=0.770$);对 Km 耐药的菌株中,北京基因型 1 株,占 100.00%(1/1),非北京基因型 0 株,占 0.00%(0/1),差异无统计学意义($P=1.000$)。**结论** 应重视广西 MDR-MTB 菌株对 EMB、Sm、Ofx 和 Km 的耐药情况;MDR-MTB 菌株主要为北京基因型;北京和非北京基因型对 EMB、Sm、Ofx 和 Km 的耐药率未见差异。

【关键词】 结核, 抗多种药物性; 基因型; 寡核苷酸序列分析; 数据说明, 统计; 小地区分析

Drug resistance and genotypic characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Guangxi Zhuang Autonomous Region LIANG Xiao-yan*, LIN Mei, LIANG Da-bin, LAN Ru-shu, QIN Hui-fang, YE Jing, HUANG Li-wen. * School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China
Corresponding author: LIN Mei, Email: gxlinmei@126.com

【Abstract】 Objective To understand the drug resistance situation, genotype composition and the correlation between genotype and drug-resistant of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-MTB) in Guangxi Zhuang Autonomous Region (referred to as Guangxi), thereby providing a theoretical basis for the prevention and control of MDR-MTB. **Methods** Using continuous monitoring methods, 5 cities including Guigang, Baise, Chongzuo, Guilin, and Fangchenggang on East, West, South, North, and Central of Guangxi were selected as monitoring points, and random number table method was used to extract 21 counties (cities, districts) from 5 cities. A total of 1514 culture-positive MTB strains which registered and treated in the local tuberculosis prevention and treatment institution were collected from 2016 to 2017. The drug susceptibility test to isoniazid (INH), rifampin (RFP), ethambutol (EMB), streptomycin (Sm), Ofloxacin (Ofx) and kanamycin (Km) was performed using the ratio method recommended by WHO. Finally, 51 strains were identified as MDR-MTB strains. Genotyping was performed by melting curve analysis-based spoligotyping (McSpoligotyping), and then the results were compared with the SpolDB 4.0 database. **Results** The drug resistance rates to EMB, Sm, Ofx and Km of 51 MDR-MTB



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

基金项目:国家自然科学基金(81560549)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学公共卫生学院(梁小烟);
广西壮族自治区疾病预防控制中心(林玫、梁大斌、覃慧芳、叶婧、黄莉雯);
广西壮族自治区江滨医院(蓝如束)

通信作者:林玫,Email: gxlinmei@126.com

strains were 41.18% (21/51), 31.37% (16/51), 9.80% (5/51) and 1.96% (1/51), respectively. Beijing genotype strains accounted for 56.86% (29/51) and non-Beijing genotype strains accounted for 43.14% (22/51). Among the strains resistant to EMB, there were 14 Beijing genotype strains, accounting for 66.67% (14/21) and 7 non-Beijing genotype strains, accounting for 33.33% (7/21), the difference was not statistically significant ($\chi^2 = 1.399$, $P = 0.237$). Among the strains resistant to Sm, there were 11 Beijing genotype strains, accounting for 68.75% (11/16) and 5 non-Beijing genotype strains, accounting for 31.25% (5/16), the difference was not statistically significant ($\chi^2 = 1.343$, $P = 0.246$). Among the strains resistant to Ofx, there were 9 Beijing genotype strains, accounting for 60.00% (9/15) and 6 non-Beijing genotype strains, accounting for 40.00% (6/15), the difference was not statistically significant ($\chi^2 = 0.085$, $P = 0.770$). Among the strains resistant to Km, there was 1 Beijing genotype strain, accounting for 100.00% (1/1), and no non-Beijing genotype strain, accounting for 0.00% (0/1), the difference was not statistically significant ($P = 1.000$). **Conclusion** We should pay attention to the resistance of MDR-MTB strains to EMB, Sm, Ofx and Km in Guangxi. MDR-MTB strains are mainly Beijing genotype. There are no significant differences in the resistance rates of Beijing and non-Beijing genotypes to EMB, Sm, Ofx and Km.

【Key words】 Tuberculosis, multidrug-resistant; Gene; Oligonucleotide array sequence analysis; Data interpretation, statistical; Small-area analysis

据全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示,我国结核病总耐药率为 42.10%,耐多药(multi-drug-resistant, MDR)发生率为 6.8%,虽较 2000 年有所下降,但仍高于全球平均水平,耐药形势不容乐观^[1]。北京基因型作为全球第二大流行菌株,与 INH、RFP、EMB 耐药的发生呈正相关,与 MDR 的发生呈强相关^[2-3]。间隔区寡核苷酸基因分型(Spoligotyping)技术是鉴定北京基因型的金标准,但其所耗时间较长,容易造成交叉污染且易出现人为判读错误;而熔解曲线间隔区寡核苷酸基因分型(melting curve analysis-based Spoligotyping, McSpoligotyping)是一种新型的基因分型技术,与传统的 Spoligotyping 相比,不仅大大缩短了实验时间,也避免了由于人工判读而导致的错误;同时其结果的准确率也较高,可用于结核病的流行病学研究^[4]。广西壮族自治区(以下简称“广西”)位于我国西南地区,由于其特殊的地理位置,结核病和 MDR-TB 疫情一直处于全国较高水平^[5-6],严重制约着广西的经济发展,然而关于广西 MDR-MTB 基因型与耐药性的关系鲜有报道。因此,本研究采用 McSpoligotyping 分型技术对收集到的 MDR-MTB 菌株进行基因分型,了解其耐药情况和基因型分布特征,同时分析基因型与耐药的关系。

材料和方法

一、菌株来源

采用连续监测的方法,选取位于广西境内东、西、南、北、中的贵港市、百色市、崇左市、桂林市、防城港市 5 个市为监测点,采用随机数字表法抽取 5 个市中的 21 个县(市、区),纳入于 2016—2017 年

在当地结核病防治(简称“结防”)机构登记治疗且培养阳性的 MTB 菌株,共 1514 株,将菌株送往广西疾病预防控制中心结核病防治所进行药物敏感性试验(简称“药敏试验”),最终有 51 株确定为 MDR-MTB 菌株,其中贵港市 12 株(23.53%)、百色市 9 株(17.65%)、崇左市 18 株(35.29%)、桂林市 5 株(9.80%)、防城港市 7 株(13.73%)。

二、研究方法

(一)药敏试验

采用 WHO^[7]推荐的比例法进行药敏试验,本研究共检测 6 种药品,包括异烟肼(INH)、利福平(RFP)、乙胺丁醇(EMB)、链霉素(Sm)、氧氟沙星(Ofx)和卡那霉素(Km)。

(二)DNA 提取(煮沸法)

取带螺旋盖的前处理管,加入 500 μl 灭菌生理盐水;用接种环在固体培养基上刮取 1~2 环 MTB 加入前处理管中;使用 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min 后,12 000 $\times g$ 离心 5 min;弃上清液,然后加入 200 μl 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液(TE)重悬菌体;置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中 15 min,取出后 12 000 $\times g$ 离心 10 min 后取其上清液置于洁净的 EP 管中备用。

(三)McSpoligotyping 基因分型

1. 操作步骤:每份样本分为 3 管进行检测,分别加扩增试剂 McSpoligotyping PCR Mix(A/B/C)。先按照每个样本 19.75 μl McSpoligotyping PCR Mix(A/B/C)+0.25 μl McSpoligotyping 酶的比例混合 PCR 反应液,混匀后 3000 $\times g$ 离心 5 s,然后抽取 20 μl 离心后的 3 种 PCR 反应液分装于 PCR 薄壁反应管中,最后加入 5 μl DNA 样本或阴/阳性对照品后置于 PCR 仪中进行扩增。

2. PCR 扩增条件和熔解曲线分析:50 ℃ 5 min→95 ℃ 10 min→(95 ℃ 15 s→57 ℃ 15 s→72 ℃ 15 s)×50 个循环→95 ℃ 1 min→35 ℃ 1 min→35 ℃~90 ℃ 以 0.04 ℃/s 的速率升温时进行熔解曲线分析,并采集羧基荧光素(FAM)、羧基罗丹明(ROX)、六氯荧光素(HEX)和吡啶二碳菁(CY5)四个通道的荧光信号。

3. 结果判读:本研究共检测 43 个间隔子,判读规则见文献[8]。将数据表提交至国际数据库 MIRU-VNTRplus (<https://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>)和 SpolDB4.0 数据库进行比对。

三、统计学处理
采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,计数资料的比较采用卡方检验或 Fisher 确切概率法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义,均为双侧检验。

结 果

一、耐药情况
51 株 MDR-MTB 菌株中,有 21 株对 EMB 耐药,16 株对 Sm 耐药,15 株对 Ofx 耐药,1 株对 Km 耐药,耐药率分别为 41.18%、31.37%、9.80% 和

1.96%。耐药形式共 9 种,包括耐 INH+RFP、耐 INH+RFP+Sm、耐 INH+RFP+EMB、耐 INH+RFP+Ofx、耐 INH+RFP+Sm+EMB、耐 INH+RFP+Sm+Ofx、耐 INH+RFP+EMB+Ofx、耐 INH+RFP+Sm+EMB+Ofx、耐 INH+RFP+Sm+EMB+Ofx+Km,其包含的菌株数分别为 23 株(45.10%)、4 株(7.84%)、4 株(7.84%)、2 株(3.92%)、5 株(9.80%)、1 株(1.96%)、6 株(11.76%)、5 株(9.80%)和 1 株(1.96%)。

二、基因分型
McSpoligotyping 将 51 株 MDR-MTB 菌株分为北京和非北京基因型两大类,其中北京基因型 29 株(56.86%),非北京基因型 22 株(43.14%)。非北京基因型包括 T 家族(含 6 株 T1、4 株 T2 和 1 株 T4)11 株(21.57%, 11/51)、U 家族 2 株(3.92%, 2/51)、MANU 家族(MANU2)1 株(1.96%, 1/51)和新发现基因型 8 株(15.69%, 8/51)。将获得的基因分型结果与 SpolDB 4.0 数据库进行比对,有 43 株被分为 18 种型别且有对应的系统集成测试(SIT)编码,典型北京基因型(SIT=1)占有所有菌株的 37.25%(19/51),有 8 株未找到相对应的 SIT 编码,为本研究新发现基因型。见表 1。

表 1 51 株耐多药结核分枝杆菌 McSpoligotyping 基因分型结果

基因家族	SIT 编码	Spoligotype 指纹图谱	菌株数	构成比(%)
北京	1		19	37.25
	190		3	5.88
	260		1	1.96
	265		3	5.88
	541		2	3.93
	1674		1	1.96
T1	51		1	1.96
	53		2	3.93
	102		1	1.96
	196		1	1.96
	393		1	1.96
T2	52		2	3.93
	153		1	1.96
	848		1	1.96
T4	40		1	1.96
U	574		1	1.96
	1570		1	1.96

基因家族	SIT 编码	Spoligotype 指纹图谱	菌株数	构成比(%)
MANU2	54		1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96
New			1	1.96

药敏情况	合计 (株)	北京基因型 [株(构成比,%)]	非北京基因型 [株(构成比,%)]	χ^2 值	P 值
EMB				1.399	0.237
耐药	21	14(48.28)	7(31.82)		
敏感	30	15(51.72)	15(68.18)		
Sm				1.343	0.246
耐药	16	11(37.93)	5(22.73)		
敏感	35	18(62.07)	17(77.27)		
Ofx				0.085	0.770
耐药	15	9(31.03)	6(27.27)		
敏感	36	20(68.97)	16(72.73)		
Km				— ^a	1.000
耐药	1	1(3.45)	0(0.00)		
敏感	50	28(96.55)	22(100.00)		

三、基因型与耐药情况相关性

北京基因型和非北京基因型菌株对 EMB、Sm、Ofx、Km 耐药情况比较见表 2,结果显示差异均无统计学意义。

MDR-TB 是全球结核病防控的主要威胁,由于其治疗效果不佳,耐受性差,且治疗费用较高,因此 MDR-TB 患者,特别是并发糖尿病和年龄较大者,更有可能导致不良治疗结局和死亡^[9-10]。关于 MDR-TB 的相关研究一直以来都是全球关注的热点。本研究对收集到的 MDR-MTB 菌株进行了药敏试验,结果发现 MDR-MTB 对 EMB、Sm、Ofx、Km 的耐药率分别为 41.18%、31.37%、9.80% 和 1.96%。对 EMB 的耐药率虽低于全国水平 (58.7%)^[11],但明显高于海南省 (27.34%)^[12]、乌

北京基因型是多个国家和地区的优势菌株,导致了 MDR-TB 的暴发,一直以来都备受全球关注^[16]。本研究采用 McSpoligotyping 对收集到的 51 株 MDR-MTB 菌株进行了基因分型,结果发现北京基因型占 56.86%,略低于以往的报道

(58.29%)^[17], 低于福建省 (67.23%)^[16]、河南省 (83.53%)^[18] 和陕西省 (86.21%)^[19], 而略高于四川省 (55.73%) 和贵州省 (55.13%)^[17], 进一步体现了北京基因型的分布具有地区差异, 表明北京基因型是广西 MDR-MTB 的主要流行菌株, 因此在今后的研究工作中, 应加强对该基因型菌株的相关研究, 进一步了解其流行和传播规律, 以便更好地控制 MDR-TB 的流行。本研究发现, 非北京基因型菌株占 43.14%, 包括 T、U、MANU 家族及新发现基因型, 其中 T 家族所占的比例最大。T 家族主要流行于中南美洲地区, 而在本研究中, T 家族占非北京基因型的 50.00%, 这可能与广西地处中越边境、西南大通道和东盟桥头堡等特殊地理位置, 对外贸易频繁, 人口流动性较大有关, 提示应加强对流动人口结核病的筛查和管理力度。新发现基因型菌株占全部菌株的 15.69%, 有待做进一步的研究。

虽然有资料报道北京基因型与 INH、RFP、Ofx 等药品耐药有关, 与 MDR 呈强相关^[2-3], 但一项关于中国南方地区 MTB 北京基因型与耐药相关性的研究结果却显示^[20], 尽管北京基因型对任一药品的耐药率均高于非北京基因型, 但除 Sm 外, 其他药品耐药与否与是否为北京基因型不相关。本研究发现北京基因型对 EMB、Sm、Ofx、Km 的耐药率均高于非北京基因型, 但差异均无统计学意义, 与以往的报道一致^[17], 也与林淑芳等^[16]、Liu 等^[21] 研究结果一致。由此可见, 北京基因型与耐药的相关性存在争议, 这可能是由于地区差异而引起, 也有可能与本研究所收集到的样本量较少有关。因此下一步应扩大样本量以发现广西北京基因型与耐药的可能相关性。

综上所述, 广西 MDR-MTB 对 EMB 的耐药率较高, 应加强对该药品的监测, 此外还应关注 MDR-MTB 对其他药品的耐药性。北京基因型为主要流行菌株, 与 EMB、Sm、Ofx、Km 耐药无统计学关联。该结论对广西 MDR-TB 的防控措施的制定有一定的指导作用。当然, 本研究尚存在不足之处, 即未对其他常用药品 (如吡嗪酰胺、左氧氟沙星等) 进行药敏试验, 未能评估北京基因型与其他药品耐药的相关性, 且由于样本量较少未能对该地区 MDR-MTB 基因型与社会人口学资料 (如性别、年龄等)、人口流动性、疾病进展等的相关性进行深入探讨, 这也将成为下一步的研究工作。

参 考 文 献

- 结核病学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.
- 董文竹, 王政, 文舒安, 等. 耐多药及广泛耐药 MTB 菌株对 SQ109 的耐药性及其与北京基因型的关系. 中国防痨杂志, 2018, 40(5): 506-511.
- Pang Y, Zhou Y, Zhao B, et al. Spoligotyping and drug resistance analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains from national survey in China. PLoS One, 2012, 7(3): e32976.
- Zeng X, Xu Y, Zhou Y, et al. McSpoligotyping, a One-Step Melting Curve Analysis-Based Protocol for Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2018, 56(8): e00539-18.
- 梁大斌, 黄敏莹, 林玫, 等. 2011—2015 年广西肺结核流行情况分析. 应用预防医学, 2017, 23(2): 133-138.
- 罗丹. 广西耐药结核病流行特征及结核分枝杆菌基因分型的研究. 南宁: 广西医科大学, 2013.
- World Health Organization. Global Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. Guidelines for surveillance of Drug resistance in tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 1997.
- 龙茜. 广西边境与非边境地区结核分枝杆菌耐药及基因型分析. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- Xu C, Pang Y, Li R, et al. Clinical outcome of multidrug-resistant tuberculosis patients receiving standardized second-line treatment regimen in China. J Infect, 2018, 76(4): 348-353.
- Wang J, Zhou M, Chen Z, et al. Survival of patients with multidrug-resistant tuberculosis in Central China: a retrospective cohort study. Epidemiol Infect, 2020, 148: e50.
- 赵冰, 宋媛媛, 逢宇, 等. 中国耐多药结核分枝杆菌二线抗结核药物敏感性分析. 中国防痨杂志, 2013, 35(10): 831-834.
- 周云, 刘瑞, 杜永国, 等. 海南省 2014—2016 年 128 株耐多药结核分枝杆菌药敏结果. 中国热带医学, 2018, 18(6): 551-554.
- 马丽, 杨建东, 陈阳贵, 等. 乌鲁木齐市 42 株耐多药结核病者耐药情况分析. 中国防痨杂志, 2016, 38(10): 888-891.
- 刘桑, 吕康言, 孟皎, 等. 360 例耐多药肺结核患者耐药情况分析. 中国防痨杂志, 2017, 39(8): 878-882.
- 喻容, 石国民, 马小华, 等. 2014 年长沙市 155 株耐多药结核分枝杆菌耐药结果分析. 实用预防医学, 2016, 23(7): 777-779.
- 林淑芳, 魏淑贞, 赵永, 等. 福建省耐多药结核分枝杆菌对吡嗪酰胺的耐药水平与基因型特征分析. 中国防痨杂志, 2018, 40(12): 1330-1334.
- 陈杏. 中国南方四省结核分枝杆菌分离株基因分型与一线药物耐药性研究. 衡阳: 南华大学, 2017.
- 石洁, 郑丹薇, 朱岩昆, 等. 河南省结核菌分离株 26 位点 MIRU-VNTR 和 Spoligotyping 分子分型及耐药分析. 中华疾病预防控制中心杂志, 2018, 22(11): 46-51.
- 李妍, 曾小红, 杨健, 等. 陕西省 87 株耐多药结核分枝杆菌寡核苷酸基因分型和耐药性分析. 现代预防医学, 2018, 45(9): 149-153.
- Zhao LL, Li MC, Liu HC, et al. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is less associated with drug resistance in south China. Int J Antimicrob Agents, 2019, 54(6): 766-770.
- Liu H, Zhang Y, Liu Z, et al. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and drug resistance to four first-line drugs: a survey in China. Front Med, 2018, 12(1): 92-97.

(收稿日期: 2020-01-02)

(本文编辑: 王然 薛爱华)

[1] 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