

华东农村地区利福平耐药结核病的分子流行病学特征研究

王继江 胡屹 蒋伟利 王伟炳 徐飏

【摘要】 目的 描述华东农村地区利福平耐药结核分枝杆菌(结核菌)的耐药相关分子特征和成簇性规律。方法 以浙江省和江苏省两个农业县结核病防治所一年内所有登记的结核菌检测阳性肺结核病例为研究对象,收集痰标本、培养分离菌株,并进行问卷调查;对培养获得的结核菌株采用比例法进行药敏试验。对获得的 65 株利福平耐药结核菌株进行 *rpoB* 基因利福平耐药决定区和 *katG* 基因异烟肼耐药相关热点区测序,采用间隔区寡核苷酸分型 (spoligotyping) 方法识别北京株,采用 IS6110 限制性内切酶多态指纹技术 (RFLP) 对分离株进行基因分型和成簇性分析。结果 92% (60/65) 的利福平耐药菌株在利福平耐药决定区 531 位 (57%)、526 位 (29%) 或 516 位 (11%) 发生突变,82% (49/60) 的 *rpoB* 基因突变菌株为耐多药结核菌 (MDR-TB); spoligotyping 识别出 54 株 (83%) 北京家族菌株; IS6110-RFLP 发现共有 24 株 (37%) 利福平耐药菌株成簇,形成 11 个簇,提示簇中病例的结核菌近期传播。所有成簇菌株都为 MDR-TB。共有 7 个簇,簇内菌株具有不完全相同的利福平耐药相关的 *rpoB* 基因突变。分析可能与成簇性相关的因素,初治病例在菌株成簇患者中的比例高于在菌株非成簇患者中所占的比例 (初治/复治: $OR = 3.342$, 95% CI : 1.081 ~ 10.32)。结论 在其他耐药结核菌 (如异烟肼耐药结核菌) 中进一步产生对利福平的选择性耐药和生长,很有可能是利福平耐药结核病流行的基础,而既往较长的不规则治疗史也为利福平耐药的发生和传播提供条件。

【关键词】 结核病,利福平耐药; *rpoB* 突变; 基因分型

Population-based molecular epidemiologic study of rifampicin-resistant tuberculosis in rural area of eastern China WANG Ji-jiang, HU Yi, JIANG Wei-li, WANG Wei-bing, XU Biao. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: XU Biao, Email: bxu@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To describe the drug resistance-related molecular characterization and clustering feature of rifampicin-resistant (RIFr) *M.tuberculosis* (*M.tb*) in rural area of eastern China. Methods All patients diagnosed as RIFr *M.tb* in Deqing and Guanyun county during one year period from 2004 to 2005 were included in the study. By proportion method of drug susceptibility test, 65 isolates were identified resistant to rifampicin and regarded as the studied strains. Hotspots of *rpoB* gene and *katG* gene were detected by direct DNA sequencing. Beijing genotype *M.tb* strains were identified by spoligotyping. IS6110-RFLP (IS6110 restriction fragment length polymorphism) and clustering analysis were performed on all RIFr *M.tb* isolates available. Results The mutations in 81 bp rifampicin-resistance determination region (RRDR) of the *rpoB* gene were observed among 60 (92%) RIFr *M.tb* isolates, with mutation in locus 531 observed in the majority of RIFr isolates (37/65). 49 (82%) of the 60 isolates were multidrug resistant TB (MDR-TB), which were referred to as resistant to both RIF and isoniazid (INH). Through spoligotyping, 54 (83%) isolates were identified as Beijing genotype strains. In clustering analysis of IS6110-RFLP, 24 isolates were grouped into 11 clusters, suggesting that the recent transmission of *M.tb* did exist among patients. Regarding the drug resistance profile in clusters, all the isolates in clusters were also MDR-TB. 7 clusters contained isolates carrying different mutations were related to RIF-resistance. Multivariate analysis showed the proportion of new cases in clustered patients is higher than that in the un-clustered patients (new/previously treated: $OR = 3.342$; 95% CI : 1.081-10.32). Conclusion The acquisition of rifampicin resistance in *M.tb* was more likely to be resulted from the selective growth of RIFr *M.tb* in the specific drug resistant *M.tb* such as isoniazid-resistant *M.tb*. Previous elongated irregular treatment might favor the epidemic of RIFr *M.tb*.

【Key words】 Rifampicin-resistant tuberculosis; *rpoB* mutation; Genotyping

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.11.024

基金项目: 国家自然科学基金 (30771843); 上海市重点学科建设项目 (B118); 国家科技重大专项 (2008ZX10003-015)

作者单位: 200032 上海, 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室

通信作者: 徐飏, Email: bxu@shmu.edu.cn

利福平(RIF)能有效杀灭巨噬细胞内生长的结核分枝杆菌(结核菌)并明显缩短抗结核治疗的时间,是治疗结核病的重要药物。结核菌对RIF的耐药性将很大程度影响结核病的治疗效果。90%~95%的结核菌RIF耐药与*rpoB*基因RIF耐药决定区(rifampicin-resistance determination region, RRDR)突变有关,主要的突变位点包括*rpoB*基因第531位、526位和516位密码子^[1,2]。结核菌的*rpoB*基因自发突变的频率低,因此人为因素很有可能是RIF耐药发生的主要原因。国外一些研究认为耐药结核菌的适应力变化会影响其传播^[3,4]。目前国内尚没有RIF耐药结核病传播的相关研究,而利用DNA指纹技术分析结核菌基因型的成簇性可以反映其在人群间的近期传播。本研究选取华东地区两个农业县一年间RIF耐药结核菌菌株,对菌株的*rpoB*基因RRDR测序,并对菌株进行基因分型,进而分析上述菌株RIF耐药相关基因分布特征,探索影响结核菌发生近期传播的危险因素。

对象与方法

1. 研究对象:选取浙江省德清县和江苏省灌云县作为研究现场。募集当地结核病防治所一年内(德清县为2004年4月1日至2005年3月31日,灌云县为2004年6月1日至2005年5月31日)登记的所有初治和复治结核患者,收集痰标本、培养分离菌株,并进行问卷调查;对培养获得的结核菌株采用比例法进行药敏试验,以RIF耐药菌株及其感染的患者为研究对象。

2. 药敏试验:药敏试验采用比例法,检测目标菌株对异烟肼(INH)、RIF、乙胺丁醇(EMB)和链霉素(SM)一线抗结核药物的敏感性。根据Canetti等^[5]方法,在培养基上4种药的最终浓度为0.2、40、2和4 mg/L。阳性结果定义为含药培养基菌落数/对照管不含药培养基菌落数>1%。耐多药结核菌(MDR-TB)指结核病患者感染的菌株体外被证实至少对INH和RIF耐药。多耐药结核菌(polydrug resistant tuberculosis, PDR-TB)指结核病患者感染的菌株体外被证实对两种或两种以上抗结核药物耐药,但不同时对INH和RIF耐药。

3. DNA 抽提:采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)抽提法提取细菌中的DNA。

4. IS6110-RFLP:根据Thierry等^[6]的方法,进行IS6110-RFLP基因分型,使用Gel Compar 4.6软件(Applied Maths)分析。以具有与其他菌株不同的

IS6110限制性内切酶图谱(IS6110片段数和/或位置)的结核菌株定义为“惟一”株;以具有完全相同IS6110限制性内切酶图谱的菌株定义为“成簇”株。假定簇内患者的结核病主要是由于近期感染了结核菌所引起。成簇比例定义为在所观察结核患者中由于感染了近期传播结核菌而得病的比例,公式为:

$$\text{成簇比例} = \frac{\text{由感染近期传播 } M.tb \text{ 致病人数}}{\text{总观察结核病人人数}}$$

5. spoligotyping:参照Kamerbeek等^[7]的方法,对结核菌株直接重复单位(direct repeat region, DR)间的间隔区进行PCR扩增,将其中二进制编码第1到34间隔区为0的菌株定义为北京家族株。

6. 基因测序:以提取的结核菌株DNA为模板,在ABI PCR仪中扩增目标基因片段,*katG*引物:正向5'-CGG TGG ATC AGC TTG TAC CAG和反向5'-CGA CGA TGC TGG CCA CTG AC;*rpoB*引物:正向5'-GGG AGC GGA TGA CCA CCC和反向5'-GCG GTA CGG CGT TTC GAT GAA C。PCR产物交上海生工生物工程技术有限公司测序。

7. 统计学分析:使用Epi Info 6.0软件建立数据库和录入数据,应用SPSS 11.0(SPSS Inc., Chicago, IL)软件进行统计学分析。单因素分析中连续变量的统计检验采用*t*检验,分类变量的分析采用 χ^2 检验;采用logistic回归分析控制年龄、性别和县别等RIF耐药结核菌成簇相关因素分析中可能的混杂因素。

结 果

1. RIF耐药患者的基本情况和耐药菌株的耐药类型:两县共纳入结核病例399例,分离到结核菌株351株。对所有菌株进行比例法药敏试验,获得65株RIF耐药菌株,25株来自德清县,40株来自灌云县。RIF单耐药结核菌有2株(3%),其余63株菌除对RIF耐药外,至少对其他一种抗结核药物耐药:53株(82%)为MDR-TB;10株(15%)同时对SM和/或EMB耐药。4株菌对四种检测药物全部耐药。

RIF耐药结核病患者的基本信息见表1。男性病例43例,女性病例22例,男女比例约为2.0:1;复治病例占65%(42/65);痰涂片结果阳性者为69%(45/65)。两县RIF耐药结核患者各项基本特征之间的差异均无统计学意义(*P*值均>0.05)。因此考虑两县研究对象情况的可比性,在进行RIF耐药结核菌近期传播相关因素的多因素分析时,将各自资料合并分析。

生成簇,因此推测RIF耐药菌株的近期传播可能在RIF耐药株流行中占有重要地位。进一步对成簇菌株的*rpoB*基因突变类型进行分析发现,64%(7/11)簇的簇内菌株*rpoB*基因突变位点不全相同,提示部分RIF耐药结核病的流行可能是多种机制联合作用的结果。分析成簇菌株耐药表型,所有菌株均对INH耐药,簇内菌株*katG*基因突变位点亦相同。一些研究发现,与INH耐药相关的*katG*基因315位Ser→Thr突变对菌株的活力和传播力影响不大,可一定程度上补偿其他耐药突变造成的菌株适应力损失^[4,15,16]。基于以上事实,猜测研究地区RIF耐药菌株流行的一种重要机制很可能是:INH耐药株近期传播感染个体以后,个体不同的治疗依从性和用药情况造成部分INH耐药株发生RIF耐药表型和基因型的积累。

患者既往治疗史与RIF耐药菌株的成簇分布明显相关(初治/复制:OR=3.342;95%CI:1.081~10.32),初治病例在菌株成簇患者中的比例高于在非成簇患者中的比例。携带利福平耐药菌株的患者由于长时间不合适的治疗等原因,带菌状态时间长,易感人群暴露机会增加,受感染发病后产生初治利福平耐药患者;与之相较,在非成簇患者中获得性耐药发生的比例可能更高一些。在菌株方面,有研究认为,北京株可能是结核菌近期传播致病的危险因素^[17,18]。本研究北京株的成簇比例为41%,高于非北京株,但差异无统计学意义(北京株/非北京株:OR=3.777,95%CI:0.689~20.699),有必要进行更大规模的研究,以证明北京株在RIF耐药以及MDR-TB传播中的作用。此外,没有发现*rpoB*基因531位突变对RIF耐药株近期传播的影响,可能说明拥有该位点突变的菌株近期传播并不是RIF耐药株流行的主要原因,提示拥有其他分子特征的结核菌(如有*katG*基因315位突变的菌株)可能在RIF耐药结核菌流行中发挥作用。

本研究结果提示,*rpoB*基因531位、526位或516位发生突变是该地区RIF耐药株产生的主要机制,反映了*rpoB*基因RRDR测序可应用于结核菌RIF耐药预测。RIF单耐药株近期传播不是其流行的主要原因,其他耐药菌株如INH耐药株对RIF的选择性耐药和生长,很有可能是RIF耐药结核菌产生的基础,有必要进一步从其他分子特征的结核菌如INH耐药株与MDR-TB传播相关性方面展开研究,从而能更好地理解我国高MDR-TB流行的机制。

参 考 文 献

- [1] Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al. Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(10):2380-2386.
- [2] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*, 1998, 79(1):3-29.
- [3] Mariam DH, Mengistu Y, Hoffner SE, et al. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(4):1289-1294.
- [4] Gagneux S, Long CD, Small PM, et al. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2006, 312(5782):1944-1946.
- [5] Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull WHO*, 1969, 41(1):21-43.
- [6] Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 1990, 28(12):2668-2673.
- [7] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(4):907-914.
- [8] 刘宇红. 第四次全国结核病流行病学抽样调查——结核分枝杆菌耐药性分析与评价. *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(4):224-227.
- [9] Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S, et al. Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA sequencing and line probe assay. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(12):4435-4438.
- [10] Traore H, Fissette K, Bastian I, et al. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance Technical Note. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000, 4:481-484.
- [11] Lemus D, Martin A, Montoro E, et al. Rapid alternative methods for detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 54(1):130-133.
- [12] Huang H, Jin Q, Ma Y, et al. Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in China. *Tuberculosis*, 2002, 82(2-3):79-83.
- [13] Yue J, Shi W, Xie J, et al. Mutations in the *rpoB* gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(5):2209-2212.
- [14] Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(4):658-685.
- [15] van Soolingen D, de Haas PE, van Doorn HR, et al. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Infect Dis*, 2000, 182(6):1788-1790.
- [16] Pym AS, Saint-Joanis B, Cole ST. Effect of *katG* mutations on the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and the implication for transmission in humans. *Infect Immun*, 2002, 70(9):4955-4960.
- [17] Prammananan T, Cheunoy W, Taechamahapun D, et al. Distribution of *rpoB* mutations among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) strains from Thailand and development of a rapid method for mutation detection. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(5):446-453.
- [18] European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(5):736-743.

(收稿日期:2009-05-06)

(本文编辑:张林东)