

基于全基因组测序的我国耐多药结核分枝杆菌耐药突变特征分析

高敏¹ 杨婷婷² 李桂莲³ 陈蓉^{1,3} 刘海灿³ 高谦² 万康林³ 奉水东¹

¹南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001; ²复旦大学基础医学院, 上海 200032; ³中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

通信作者: 奉水东, Email: shuidong_f@hotmail.com; 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

【摘要】 目的 利用全基因组测序数据分析中国耐多药结核分枝杆菌的耐药相关基因突变谱及主要突变类型与菌株基因型的相关性。方法 查询并下载 NCBI 数据库中截至 2019 年 8 月公开发表的我国结核分枝杆菌全基因组测序数据, 利用全基因组数据预测菌株分子药敏结果, 统计不同药物耐药相关基因的突变类型, 并分析耐药突变类型与菌株基因型的相关性。结果 根据分子药敏结果从 2 019 株菌株中鉴定出 1 024 株耐多药菌株, 对常用抗结核药物的耐药相关基因主要突变类型分别为 *katG* S315T (73.2%, 异烟肼)、*rpoB* S450L (63.1%, 利福平)、*rpsL* K43R (70.0%, 链霉素)、*embB* M306V (37.4%, 乙胺丁醇)、*pncA* 启动子区 T(-11)C (7.9%, 吡嗪酰胺)、*gyrA* A90V (32.3%, 氟喹诺酮类)、*rrs* A1401G (67.7%, 二线注射类)、*fabG1* 启动子区 C(-15)T (87.0%, 乙硫异烟胺)、*folC* I43T (30.4%, 对氨基水杨酸)。其中, *katG* S315T、*rpsL* K43R、*embB* M306V、*gyrA* D94G 在 L2 系菌株中的频率显著高于 L4 系菌株, *folC* I43T 仅在 L2 系菌株中发现; *katG* S315T 在古典北京型菌株中比例较高, 而 *rpsL* K43R 在现代北京基因型菌株中的比例更高, 其差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 本研究提供了基于全基因组测序的我国耐多药结核分枝杆菌对多种常用抗结核药的耐药相关基因主要突变类型, 为研发敏感、特异的快速分子检测方法提供了依据; 同时也发现多种耐药相关基因主要突变类型与菌株基因型有关。

【关键词】 结核分枝杆菌; 耐药; 全基因组测序

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2018JJ2342); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20190759); 国家科技重大专项 (2018ZX10103001-003-012)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20191111-00800

Analysis on drug resistance-associated mutations of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* based on whole-genome sequencing in China

Gao Min¹, Yang Tingting², Li Guilian³, Chen Rong¹, Liu Haican³, Gao Qian², Wan Kanglin³, Feng Shuidong¹

¹School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China; ²School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China; ³State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding authors: Feng Shuidong, Email: shuidong-f@hotmail.com; Wan Kanglin, Email: wankanglin@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To analyze the resistance mutational profiles of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China and the correlation between major mutation types and genotypes based on the whole-genome sequencing data. **Methods** Search and download of the genome-wide sequencing data of *M. tuberculosis* published in China by August 2019 on NCBI database were conducted. Mutation frequency of drug resistance-related gene loci based on whole-genome sequencing was used to predict the molecular susceptibility of strains, and the correlation between mutation types and genotypes was analyzed. **Results** According to the results of molecular resistance and susceptibility profiles, 1 024 MDR strains were identified from 2 019 *M. tuberculosis* strains. The major mutation types of resistance-related genes to common drugs were *katG* S315T (73.2%, isoniazid), *rpoB* S450L (63.1%, rifampicin), *rpsL* K43R (70.0%, streptomycin), *embB* M306V (37.4%, ethambutol), *pncA* promoter T(-11)C (7.9%, pyrazinamide), *gyrA* A90V (32.3%, fluoroquinolones), *rrs* A1401G (67.7%, second-line injection drugs), *fabG1* promoter C(-15) T (87.0%, Ethionamide),

folC I43T (30.4%, P-aminosalicylic acid). Among them, the frequencies of *katG* S315T, *embB* M306V, *rpsL* K43R, *gyrA* A90V in lineage 2 were significantly higher than those in lineage 4, and *folC* I43T was only found in lineage 2. The proportion of *katG* S315T was significantly higher in the ancient Beijing genotype compared to the modern genotype, in contrast, the proportion of *rpsL* K43R was significantly higher in modern Beijing genotype, the differences were significant (all $P < 0.05$).

Conclusions The results showed the main mutation types of resistance-related genes of MDR strains to many commonly used anti-tuberculosis drugs in China based on whole-genome sequencing, providing a basis for the development of sensitive and specific rapid molecular detection methods. At the same time, it was also found that the major mutation types of MDR-related genes were related to the genotype of the strains.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Drug resistance; Whole genome sequencing

Fund programs: Hunan Natural Science Foundation (2018JJ2342); Hunan Provincial Innovation Foundation For Postgraduate (CX20190759); National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10103001-003-012)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20191111-00800

耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)是全球及我国主要的公共卫生问题之一。据2019年WHO估计^[1],中国耐多药/利福平耐药结核病(MDR/RR-TB)患者数位居全球第二,约6.6万例,而MDR/RR-TB治愈率仅为52%(2016年开始二线药物治疗后)。因此快速准确鉴定MDR-TB患者,对指导早期临床用药、提高治愈率具有重要意义。

目前,表型药敏试验(drug susceptibility testing, DST)被认为是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)耐药检测的金标准,但此方法操作繁琐且耗时长(10 d至4周),在此期间患者极有可能被不合理用药,反而增加耐药风险^[2]。分子药敏检测(molecular drug susceptibility testing, mDST)可以实现耐药结核病的快速诊断(约2 h得到结果),但检测的敏感性依赖于检测耐药突变位点的数量。由于目前快速诊断方法只能检测数量有限的耐药突变位点,而耐药突变谱(突变类型及突变频率)存在地区差异^[3-6],因此,全面了解不同地区MTB的耐药突变谱,对于选择适合的耐药突变位点组合,提高mDST的敏感性具有重要意义。全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)可检测目前所有已知的耐药相关突变;对一线及常见二线药物耐药性检测的敏感性、特异性均超过85.0%;另对异烟肼(INH)和利福平(RIF)等一线药物敏感性预测准确性也可达95.0%以上^[7-9]。这表明WGS可为临床治疗尤其是为MDR-TB诊治提供更多有效信息。本研究通过收集NCBI数据库中2019年8月前发表的我国MDR-TB菌株WGS数据,分析耐药相关基因的突变谱及主要突变类型与菌株基因型的相关性。

资料与方法

1. WGS数据收集:以“*Mycobacterium tuberculosis*”“whole genome sequencing”及“China”为关键词,在

NCBI上搜索2019年8月前已发表的包含菌株地理信息及WGS数据的相关文献,并从NCBI和EMBL-EBI上下载相应的测序数据^[7,10-17]。

2. 测序菌株质控及筛选:首先使用Scythe(<https://github.com/ucdavisbioinformatics/scythe>)和Sickle(<https://github.com/najoshi/sickle>)软件去除测序数据样本中的接头序列和低质量的碱基(Phred < 20)。然后采用Bowtie2(<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2>)软件将保留的高质量序列数据比对到MTB标准菌株H37Rv基因组序列上(GenBank accession NC_000962.3)。根据比对结果,筛选平均测序深度>10倍、基因组覆盖度>95%的测序数据样本,最终获得2 019株满足分析要求的WGS数据。

3. 单核苷酸多态性(SNP)鉴定:使用Samtools(<http://www.htslib.org/>)工具包鉴定每株菌株相对于H37Rv的SNP,筛选比对质量≥30的SNP。采用VarScan(<http://varscan.sourceforge.net>)软件鉴定固定突变(频率≥75%,至少10条序列支持)。

4. 耐药相关基因突变鉴定及耐多药菌株筛选:将下载的WGS数据与目前已知的MTB耐药相关基因突变数据库进行比对^[18-19],INH耐药相关基因包括*inhA*、*katG*、*ahpC*、*fabG1*、*kasA*;RIF耐药相关基因包括*rpoB*;乙胺丁醇(EMB)耐药相关基因包括*embA*、*embB*、*embC*;吡嗪酰胺(PZA)耐药相关基因包括*pncA*、*rpsA*;链霉素(SM)耐药相关基因包括*rrs*、*rspL*;氟喹诺酮类(FQs)耐药相关基因包括*gyrA*、*gyrB*,二线注射类(second-line injectable drugs, SLID)耐药相关基因包括*rrs*、*eis*;乙硫异烟胺(ETO)耐药相关基因包括*ethA*、*ethR*、*inhA*;对氨基水杨酸(PAS)耐药相关基因包括*thyA*、*floC*、*ribB*;利奈唑胺(LZD)耐药相关基因包括*rhl*、*rplC*;氯法齐明(CFZ)、贝达喹啉(BDQ)检测Rv0678;经比对获得2 019株

MTB的耐药突变情况;再根据INH和RIF耐药相关基因突变的有无情况,筛选出MDR菌株。

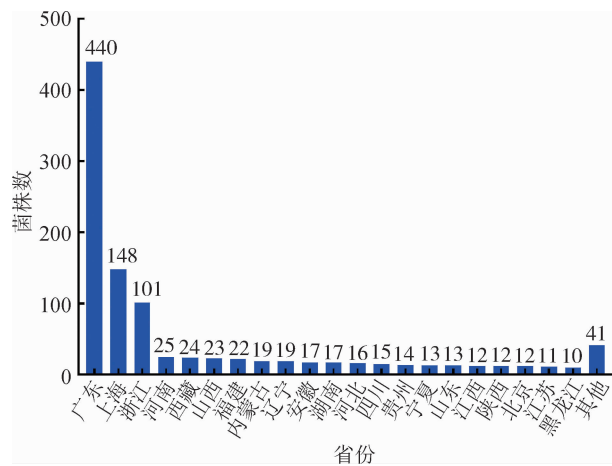
5. 系统发生树构建及菌株分型:排除位于基因组重复区域(如PPE/PE-PGRS家族基因、噬菌体序列、插入或移动元件)的SNP,将每个菌株中的SNP按照位置整合成一条序列。合并MDR菌株的SNP序列,去除在5%以上的菌株中有gap的位点(由于插入、缺失、低覆盖度或比对质量等造成)。采用MEGA X(<https://www.megasoftware.net>)软件,基于Neighbor-joining方法构建系统发生树,bootstrap值为100。将SNP与MTB各谱系和亚型的特异性突变进行比较,鉴定每株菌株所属的谱系及亚型。

6. 成簇菌株鉴定:编写Perl脚本计算MDR菌株两两之间的SNP距离,以12个SNP为界,鉴定成簇的菌株^[10]。

7. 统计学分析:利用SPSS 20.0软件,按 $\alpha=0.05$ 的水准,通过 χ^2 检验或校正 χ^2 检验分析不同药物主要突变类型的发生频率在谱系间(L2和L4系)以及谱系内各亚型间(现代北京基因型与古典北京基因型)差异是否有统计学意义。

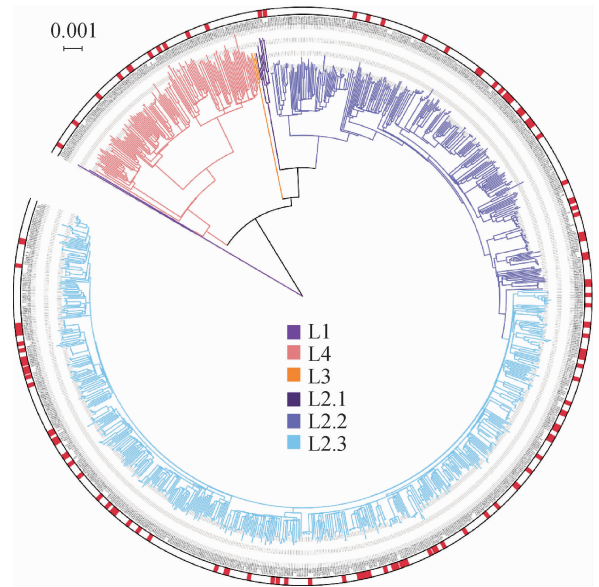
结 果

1. MDR 菌株来源及遗传结构:共收集到国内2 019株MTB WGS数据,再根据INH和RIF耐药相关基因突变结果共鉴定出1 024株MDR菌株(至少同时耐INH和RIF)。其主要来源于2007年全国耐药基线调查377株、深圳420株、上海118株、浙江100株,菌株来源分布已覆盖全国30个省份,不同城市菌株具体分布情况见图1。1 024株MDR菌株中,28.2%为早期广泛耐药MTB,其中FQs耐药占



注:其他包括菌株数<10株的9个省份(重庆、湖北、甘肃、广西、吉林、青海、天津、新疆、云南)之和

图1 1 024株耐多药结核杆菌来源地区分布



注:不同颜色的分支表示相应菌株所属的谱系,外圈红色区域表示以SNP≤12定义成簇时,各谱系中的成簇菌株

图2 1 024株结核分枝杆菌遗传结构

24.1%, SLID耐药占4.1%;6.0%为广泛耐药MTB。此外,研究中检测到1株存在LZD耐药相关基因突变(*rplC* C154R),未检测到CFZ、BDQ耐药突变株。

为了解本研究中MDR-TB菌株的遗传结构情况,经MEGA X软件构建进化树(图2),发现1 024株MDR菌株可分为4个谱系(L1、L2、L3、L4):以L2系为主,共881株(86.0%);其次是L4系,共138株(13.5%);L1和L3系菌株共5株(0.5%)。另发现L2系菌株主要由3种亚型组成,589株(66.8%)为L2.3系,284株(32.2%)为L2.2系,另外8株(1.0%)为L2.1系。

2. MDR-TB菌株耐药突变特点:为了排除由于传播导致的对特定耐药突变类型频率的影响,首先鉴定了代表近期传播的成簇菌株。以SNP≤12定义成簇^[10],共鉴定出84个簇共227株(22.2%)成簇菌株,平均每个簇包括3个菌株(簇大小为2~8个),非成簇菌株797株。成簇菌株突变类型统计按每个传播簇分别进行计数,每个传播簇中所有出现的突变类型皆以计数一次的方式进行统计^[20]。按此方法计算,本研究MDR-TB菌株相当于共881株,其对不同药物的耐药相关基因突变情况见表1。

一线药物中,INH不同耐药相关基因突变频率为*katG*(87.2%)、*fabG1*启动子区(16.2%)、*ahpC*启动子区(7.5%)、*inhA*(1.5%)、*kasA*(0.1%),耐药基因中共产生57种突变类型,其中最主要的突变类型为*katG* S315T(73.2%);此外,发现104株(11.8%)INH耐药株中存在≥2个位点联合突变,以*katG*和*fabG1*启动子区联合突变居多。在RIF耐药相关*rpoB*基因

表1 耐多药结核分枝杆菌耐不同药物的突变谱构成

药物	耐药菌株数(%)	突变类型	突变菌株数	突变百分比(%)
INH	881(100.0)	<i>katG</i> S315T	645	73.2
		<i>fabG1</i> 启动子区 C(-15)T	120	13.6
		其他	228	25.9
RIF	881(100.0)	<i>rpoB</i> S450L	512	63.1
		<i>rpoB</i> H445Y	64	7.9
		<i>rpoB</i> L430P	57	7.0
		<i>rpoB</i> H445D	46	5.7
		其他	326	37.0
EMB	561(63.7)	<i>embB</i> M306V	210	37.4
		<i>embB</i> M306I	123	21.9
		<i>embB</i> Q497R	41	7.3
		<i>embB</i> G406A	31	5.5
		其他	214	38.1
PZA	267(30.3)	<i>pncA</i> 启动子区 T(-11)C	21	7.9
		其他	252	94.4
SM	627(71.2)	<i>rpsL</i> K43R	439	70.0
		<i>rpsL</i> K88R	98	15.6
		<i>rrs</i> A1401G	63	10.1
		<i>rrs</i> A514C	61	9.7
		其他	31	4.9
FQs	269(30.5)	<i>gyrA</i> A90V	87	32.3
		<i>gyrA</i> D94G	77	28.6
		<i>gyrA</i> D94A	49	18.2
		<i>gyrA</i> D94N	21	7.8
		<i>gyrA</i> D94Y	17	6.3
		其他	49	18.2
		AMK	78(8.9)	<i>rrs</i> A1401G
CAP	65(7.4)	<i>rrs</i> C517T	13	16.7
		其他	2	2.5
		<i>rrs</i> A1401G	63	96.9
KAN	82(9.3)	其他	2	3.1
		<i>rrs</i> A1401G	63	76.8
ETO	138(15.7)	<i>eis</i> 启动子区 C(-10)T	8	9.8
		其他	13	15.9
		<i>fabG1</i> 启动子区 C(-15)T	120	87.0
		<i>fabG1</i> 启动子区 T(-8)C	11	8.0
PAS	69(7.8)	其他	15	10.9
		<i>folC</i> I43T	21	30.4
		<i>thyA</i> H75N	19	27.5
		<i>folC</i> S150G	6	8.7
		<i>folC</i> I43A	6	8.7
		<i>thyA</i> R235P	6	8.7
		<i>folC</i> E153G	5	7.3
其他	15	21.7		

注:INH:异烟肼; RIF:利福平; EMB:乙胺丁醇; PZA:吡嗪酰胺; SM:链霉素; FQs:氟喹诺酮类; AMK:阿米卡星; CAP:卷曲霉素; KAN:卡那霉素; ETO:乙硫异烟胺; PAS:对氨基水杨酸;其他为该种药物中单个突变类型<5%的类型之和

上共发现50种突变类型,其中95.8%(844/881)的突变发生在RIF耐药决定区,最主要的突变类型为*rpoB* S450L(63.1%);且发现116株(13.2%)RIF耐药株存在≥2个位点的联合突变。本研究未发现EMB耐药相关基因*embC*突变菌株,仅发现*embB*基因和*embA*启动子突变菌株,其中*embB*基因306、406、497、354和1024位点分别占64.1%、13.9%、10.7%、3.7%和3.4%,*embA*启动子区中-11、-12和-16位点

分别占1.4%、4.5%和3.0%;耐药基因中共产生24种突变类型,其中最主要的突变类型为*embB* M306V(37.2%)和M306I(22.6%),且发现57株(10.2%)存在位点联合突变。对PZA耐药相关基因*pncA*进行分析发现,其突变位点分散,几乎遍布整个启动子区域及编码区域,突变类型多达118种,突变频率稍高的是*pncA*启动子区T(-11)C(21株,7.9%)。对SM耐药相关基因*rrs*和*rpsL*进行分析,共发现13种突变类型,其中最主要的突变类型为*rpsL* K43R(70.0%),另发现59株(9.4%)存在位点联合突变。

二线药物中,FQs耐药相关基因突变以*gyrA*(90.7%,244/269)基因突变为主,在FQs耐药决定区的突变占90.6%(242/881),主要突变类型为*gyrA* A90V(32.3%)与D94G(28.6%)。分析与SLID耐药相关的*rrs*和*eis*启动子区域,突变类型以*rrs* A1401G(67.7%)为主。分析与ETO耐药相关的*fabG1*启动子区和*inhA*基因发现主要的突变类型为*fabG1*启动子区C(-15)T(87.0%)。分析与PAS耐药相关的*folC*和*thyA*,发现主要突变类型为*folC* I43T(30.4%)与*thyA* H75N(27.5%)。

3. 遗传背景与耐药突变的相关性分析:881株MDR菌株中,749株(86.0%)为L2系菌株,127株(13.5%)为L4系菌株,5株(0.5%)为L1和L3系菌株。由于L1和L3系菌株数较少(<1.0%),本研究仅分析了L2和L4系菌株与耐药突变类型的相关性(表2)。结果显示,*katG* S315T(INH)、*embB* M306V(EMB)、*rpsL* K43R(SM)、*gyrA* D94G(FQs)在L2系中的比例高于在L4系,差异均有统计学意义($P<0.05$);同时,与PAS耐药相关的*folC* I43T和*thyA* H75N两种突变类型仅在L2系菌株中发现。

749株L2系菌株中,497株(66.3%)为L2.3系(现代北京基因型)菌株,245株(32.7%)为L2.2系(古典北京基因型)菌株,7株(1.0%)为L2.1系菌株。因L2.1菌株较少(≤1%),因此本研究仅分析现代北京基因型与古典北京基因型菌株与各药物耐药相关的主要突变类型的相关性(表2)。结果显示,*katG* S315T(INH)、*fabG1*启动子区C(-15)T(INH)、*rpsL* K43R(SM)和*fabG1*启动子区C(-15)T(ETO)在两种亚型中的分布差异有统计学意义($P<0.05$),*fabG1*启动子区C(-15)T(ETO)的差异与INH交叉耐药有关。进一步分析发现,现代北京基因型菌株中*rpsL* K43R(SM)的发生率高于古典北京基因型菌株,而*katG* S315T(INH)则相反,另*thyA* H75N(PAS)仅在古典北京基因型菌株中发现。

表 2 不同药物主要突变类型在不同基因型中分布情况

药物	突变类型	L2(n=749)			突变菌株	L4(n [*] =127)	P ₂ 值
		现代型(n=497)	古典型(n=245)	P ₁ 值			
INH	<i>katG</i> S315T	347(69.8)	206(84.0)	0.000	560(74.8)	82(64.6)	0.016
	<i>fabG1</i> 启动子区 C(-15)T	90(18.1)	14(5.7)	0.000	104(13.9)	15(11.8)	0.528
RIF	<i>rpoB</i> S450L	299(60.2)	135(55.1)	0.188	437(58.3)	72(56.7)	0.727
EMB	<i>embB</i> M306V	124(24.9)	63(25.7)	0.822	190(25.4)	20(15.7)	0.019
	<i>embB</i> M306I	68(13.7)	32(13.0)	0.816	101(13.5)	22(17.3)	0.250
SM	<i>rpsL</i> K43R	310(62.4)	112(45.7)	0.000	423(56.5)	15(11.8)	0.000
FQs	<i>gyrA</i> A90V	51(10.3)	26(10.6)	0.883	78(10.4)	9(7.1)	0.246
	<i>gyrA</i> D94G	50(10.1)	22(9.0)	0.640	72(9.6)	5(3.9)	0.037
SLID	<i>rrs</i> A1401G	40(8.0)	19(7.8)	0.890	59(7.9)	4(3.1)	0.057
ETO	<i>fabG1</i> 启动子区 C(-15)T	90(18.1)	14(5.7)	0.000	104(13.9)	15(11.8)	0.528
PAS	<i>folC</i> I43T	8(1.6)	13(5.3)	0.004	21(2.8)	0	-
	<i>thyA</i> H75N	0(0.0)	19(7.8)	-	19(2.5)	0	-

注:INH:异烟肼; RIF:利福平; EMB:乙胺丁醇; SM:链霉素; FQs:氟喹诺酮类; SLID:二线注射类; ETO:乙硫异烟胺; PAS:对氨基水杨酸; 括号外数据为菌株数,括号内数据为百分比(%); *L4中菌株突变的数量; P₁表示现代型与古典型比较; P₂表示L2与L4比较;耐PZA中主要突变数量(<3%)较少,故不作分析; -:不适用该种统计方法

讨 论

本研究采用WGS分析,获得了我国MDR菌株耐15种药物的耐药相关基因突变特征。目前国内对耐药突变特征研究主要采用PCR-DNA测序法^[21-25],仅检测高频耐药突变基因,如INH中仅检测*katG*、*inhA*启动子区和*oxyR-ahpC*, EMB仅检测*embB*基因,并未检测已知与INH耐药相关的*kasA*以及与EMB耐药相关的*embA*启动子区区域。相比之下,本研究采用WGS方法,能够分析所有已知的耐药突变位点,获得更全面的耐药突变特征。另外,本研究的样本量较大、覆盖地区范围较广、药物种类较多^[21-25],该结果将为设计新的耐药结核病分子诊断检测方法选择耐药突变位点组合提供可靠的依据。

目前国内主要对INH、RIF、EMB、FQs和SLID药物进行了耐药相关基因突变特征研究,本研究发现不同药物的主要突变类型与已有研究一致^[6]。与河北、江西地区相比,发现INH、RIF和SLID耐药相关基因的主要突变类型一致,但突变频率存在差异;而与FQs耐药相关的*gyrA*基因中,这两个地区菌株突变以D94G为主^[26-27]。本研究PAS耐药相关的主要突变类型与西南地区研究结果一致^[28]。文献报道显示,PZA主要耐药相关基因为*pncA*,但其突变类型较多^[29-30],本研究发现主要突变类型为*pncA*启动子区T(-11)C(7.9%),与国内一项收集浙江、江苏、四川省菌株分析的结果(6.8%)相似^[29],但与中国南方地区(*pncA* 132位点突变占12.3%)研究结果差异较大^[30],其耐药机制可能还需进一步研究。总体而言,国内不同地区抗结核药物耐药谱中主要突变类型基本一致,但突变频率可能存在一定的差异,其可能与研究样本量、菌株基因型差异、就诊用药习惯及患者

依从性等因素有关。

由于不同地区的耐药突变谱不同可能导致同一分子检测方法在不同地区检测的灵敏度存在差异^[4,6],例如,对于INH、RIF的研究,巴基斯坦使用GenoType MTBDRplus检测的灵敏度为71.7%~79.2%^[4];巴西检测灵敏度为83.3%~93.3%^[31];中国地区检测的灵敏度为82.1%~98.7%^[6],提示不同地区耐药突变位点的组合应根据当地突变特点来选择,这样可以提高检测灵敏度。本研究提示Xpert、GenoType、MeltPro法在我国INH、RIF、FQs、SLID耐药检测中的代表性较好,EMB耐药检测结果稍差。此外,本研究结果显示SLID耐药相关突变类型*rrs* C517T占14.0%, EMB耐药相关*embB* 354位点突变占3.7%、1 024位点突变占3.4%及*embA*启动子-16~-11位点突变占8.9%,在mDST中加入这些检测位点可明显提高我国SLID和EMB的耐药检出率。

同一药物在不同地区报道的耐药突变谱不同,其原因可能与研究的样本量、用药习惯、社会经济等因素有关外,也可能与地区流行菌株的遗传背景差异有关^[14,20,32]。本研究分析主要耐药突变类型与菌株基因型的相关性,结果发现我国L2系菌株中*katG* S315T (INH)、*embB* M306V (EMB)、*gyrA* D94G (FQs)的频率显著高于L4系菌株。*katG* S315T在我国INH耐药菌株中占73.2%,该比例显著高于主要流行L3系的印度地区(62.6%)及主要流行L4系的墨西哥地区(60.0%)^[33-34]。另外我国EMB和FQs耐药株中,最主要的突变类型分别为*embB* M306V (37.4%)和*gyrA* A90V (32.3%),该耐药突变谱与主要流行L3系的巴基斯坦地区相比也存在较大差异,其主要突变类型分别为*embB* M306I、*gyrA* D94G (20%~35%)^[4,35]。总的来说,我国以L2系菌株为主

要流行株的地区, INH、EMB、FQs 突变类型及频率与其他谱系菌株流行地区存在差异。

本研究存在局限性。收集的 MDR 菌株虽然已覆盖全国 30 个省份, 但不同省份菌株数量差异较大, 如深圳及上海地区采样较多。同时由于缺少菌株相应的 DST 结果, 文中统计的突变位点比例可能与根据表型药敏结果计算得到的突变率存在一定差距。

综上所述, 本研究提供了我国 MDR 菌株对一线及二线抗结核药物的耐药相关基因突变谱和主要突变类型及其与菌株谱系的相关性, 为研究适合我国临床流行菌株特点的新的耐药突变位点组合、提高 mDST 的灵敏度、精准地指导临床用药提供了较全面的数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2019 [M]. Geneva: World Health Organization, 2019.
- [2] Shea J, Halse TA, Lapierre P, et al. Comprehensive whole-genome sequencing and reporting of drug resistance profiles on clinical cases of *Mycobacterium tuberculosis* in New York state [J]. J Clin Microbiol, 2017, 55 (6) : 1871-1882. DOI: 10.1128/jcm.00298-17.
- [3] Singhal R, Reynolds PR, Marola JL, et al. Sequence analysis of fluoroquinolone resistance-associated genes *gyrA* and *gyrB* in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients suspected of having multidrug-resistant tuberculosis in New Delhi, India [J]. J Clin Microbiol, 2016, 54 (9) : 2298-2305. DOI: 10.1128/jcm.00670-16.
- [4] Javed H, Bakula Z, Pleñ M, et al. Evaluation of genotype MTBDR_{plus} and MTBDR_{sl} assays for rapid detection of drug resistance in extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Pakistan [J]. Front Microbiol, 2018, 9 : 2265. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02265.
- [5] Nguyen TNA, Anton-Le Berre V, Bauls AL, et al. Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis: a literature review [J]. Front Microbiol, 2019, 10 : 794. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00794.
- [6] Jian J, Yang X, Yang J, et al. Evaluation of the GenoType MTBDR_{plus} and MTBDR_{sl} for the detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China [J]. Infect Drug Resist, 2018, 11 : 1627-1634. DOI: 10.2147/idr.s176609.
- [7] Chen XC, He GQ, Wang SY, et al. Evaluation of Whole-Genome Sequence Method to Diagnose Resistance of 13 Anti-tuberculosis drugs and characterize resistance genes in clinical multi-drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China [J]. Front Microbiol, 2019, 10 : 1741. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01741.
- [8] Allix-Beguec C, Arandjelovic I, Bi L, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing [J]. N Engl J Med, 2018, 379 (15) : 1403-1415. DOI: 10.1056/NEJMoal800474.
- [9] Nimmo C, Doyle R, Burgess C, et al. Rapid identification of a *Mycobacterium tuberculosis* full genetic drug resistance profile through whole genome sequencing directly from sputum [J]. Int J Infect Dis, 2017, 62 : 44-46. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.07.007.
- [10] Yang CG, Luo T, Shen X, et al. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China: a retrospective observational study using whole-genome sequencing and epidemiological investigation [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17 (3) : 275-284. DOI: 10.1016/s1473-3099(16)30418-2.
- [11] Zhang HT, Li DF, Zhao LL, et al. Genome sequencing of 161 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance [J]. Nat Genet, 2013, 45 (10) : 1255-1260. DOI: 10.1038/ng.2735.
- [12] Hicks ND, Yang J, Zhang XB, et al. Clinically prevalent mutations in *Mycobacterium tuberculosis* alter propionate metabolism and mediate multidrug tolerance [J]. Nat Microbiol, 2018, 3 (9) : 1032-1042. DOI: 10.1038/s41564-018-0218-3.
- [13] Liu QY, Ma AJ, Wei LH, et al. China's tuberculosis epidemic stems from historical expansion of four strains of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Nat Ecol Evol, 2018, 2 (12) : 1982-1992. DOI: 10.1038/s41559-018-0680-6.
- [14] Huang HR, Ding N, Yang TT, et al. Cross-sectional whole-genome sequencing and epidemiological study of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in China [J]. Clin Infect Dis, 2018, 69 (3) : 405-413. DOI: 10.1093/cid/ciy883.
- [15] Yang CG, Lu LP, Warren JL, et al. Internal migration and transmission dynamics of tuberculosis in Shanghai, China: an epidemiological, spatial, genomic analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18 (7) : 788-795. DOI: 10.1016/s1473-3099(18)30218-4.
- [16] Luo T, Comas I, Luo D, et al. Southern East Asian origin and coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family with Han Chinese [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (26) : 8136-8141. DOI: 10.1073/pnas.1424063112.
- [17] Jiang Q, Liu QY, Ji LC, et al. Citywide transmission of multidrug-resistant tuberculosis under China's rapid urbanization: a retrospective population-based genomic spatial epidemiological study [J]. Clin Infect Dis, 2019 : ciz79. DOI: 10.1093/cid/ciz790.
- [18] Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2015, 15 (10) : 1193-1202. DOI: 10.1016/s1473-3099(15)00062-6.
- [19] Coll F, McNerney R, Preston MD, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences [J]. Genome Med, 2015, 7 : 51. DOI: 10.1186/s13073-015-0164-0.
- [20] Castro RAD, Ross A, Kamwela L, et al. The genetic background modulates the evolution of fluoroquinolone-resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Mol Biol Evol, 2019, 37 (1) : 195-207. DOI: 10.1093/molbev/msz214.
- [21] Zhang ZJ, Lu J, Liu M, et al. Genotyping and molecular characteristics of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China [J]. J Infect, 2015, 70 (4) : 335-345. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.11.008.
- [22] Li YN, Wang YL, Zhang Z, et al. Association between *embB* Codon 306 mutations, phenotypic resistance profiles, and genotypic characterization in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei, China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60 (12) : 7295-7302. DOI: 10.1128/aac.00532-16.
- [23] Zhao LL, Chen Y, Liu HC, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58 (4) : 1997-2005. DOI: 10.1128/aac.01792-13.
- [24] Li QL, Gao HX, Zhang Z, et al. Mutation and transmission profiles of second-line drug resistance in clinical isolates of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Hebei Province, China [J]. Front Microbiol, 2019, 10 : 1838. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01838.
- [25] Zhao LL, Huang MX, Xiao TY, et al. Prevalence, risk and genetic characteristics of drug-resistant tuberculosis in a tertiary care tuberculosis hospital in China [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12 : 2457-2465. DOI: 10.2147/idr.s209971.
- [26] Li QL, Wang YL, Li YN, et al. Characterisation of drug resistance-associated mutations among clinical multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Hebei Province, China [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 18 : 168-176. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.03.012.
- [27] Yuan XL, Zhang TT, Kawakami K, et al. Molecular characterization of multidrug- and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Jiangxi, China [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50 (7) : 2404-2413. DOI: 10.1128/jcm.06860-11.
- [28] Luo M, Li K, Zhang HZ, et al. Molecular characterization of para-aminosalicylic acid resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in southwestern China [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12 : 2269-2275. DOI: 10.2147/idr.s207259.
- [29] Li DG, Hu Y, Werngren J, et al. Multicenter study of the emergence and genetic characteristics of pyrazinamide-resistant tuberculosis in China [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60 (9) : 5159-5166. DOI: 10.1128/aac.02687-15.
- [30] Pang Y, Zhu DM, Zheng HW, et al. Prevalence and molecular characterization of pyrazinamide resistance among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Southern China [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17 : 711. DOI: 10.1186/s12879-017-2761-6.
- [31] Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho WDS, et al. Correlation between the BACTEC MGIT 960 culture system with Genotype MTBDR_{plus} and TB-SPRINT in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2017, 112 (11) : 769-774. DOI: 10.1590/0074-02760170062.
- [32] Alene KA, Viney K, McBryde ES, et al. Risk factors for multidrug-resistant tuberculosis in northwest Ethiopia: a case-control study [J]. Transbound Emerg Dis, 2019, 66 (4) : 1611-1618. DOI: 10.1111/tbed.13188.
- [33] Madrazo-Moya CF, Cancino-Muñoz I, Cuevas-Córdoba B, et al. Whole genomic sequencing as a tool for diagnosis of drug and multidrug-resistance tuberculosis in an endemic region in Mexico [J]. PLoS One, 2019, 14 (6) : e0213046. DOI: 10.1371/journal.pone.0213046.
- [34] Polu GP, Mohammad Shaik J, Kota NMK, et al. Analysis of drug resistance mutations in pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Southern coastal region of Andhra Pradesh, India [J]. Braz J Infect Dis, 2019, 23 (5) : 281-290. DOI: 10.1016/j.bjid.2019.07.002.
- [35] Couvin D, Reynaud Y, Rastogi N. Two tales: Worldwide distribution of Central Asian (CAS) versus ancestral East-African Indian (EAI) lineages of *Mycobacterium tuberculosis* underlines a remarkable cleavage for phylogeographical, epidemiological and demographical characteristics [J]. PLoS One, 2019, 14 (7) : e0219706. DOI: 10.1371/journal.pone.0219706.

(收稿日期: 2019-11-11)

(本文编辑: 王玉立)