

华东农村地区耐药结核病传播及其影响因素的分子流行病学研究

徐飏 胡屹 王伟炳 蒋伟利

【摘要】目的 对江苏和浙江省两个农业县全年登记的结核病患者中分离获得的耐药结核分枝杆菌(结核菌)进行基因分型,描述以基因型“成簇性”为定义的耐药结核病在该地近期传播及其影响因素。**方法** 以结核菌散在分布重复单位(MIRU)和IS6110限制性内切酶片段长度多态性(IS6110-RFLP)基因分型技术识别耐药结核菌基因型的“成簇性”和“惟一性”,描述223例耐药结核病患者结核菌分离株的成簇性分布特征,识别耐药结核菌的人群间传播,分析人口学特征、社会经济水平和就医行为对耐药结核病传播的影响。**结果** 223株耐药结核菌株中有52株具有成簇性,形成22个簇,提示簇内患者间发生了耐药结核病的近期传播;其余171株的基因型表现为“惟一性”。耐药结核菌成簇性影响因素分析显示:与18~30岁人群相比,30~60岁年龄组(30~岁/18~岁年龄组:30.9% vs. 11.9%; $OR=3.297$, 95% CI : 1.169~9.297)和复治耐药结核病患者(复治/初治:32.9% vs. 18.4%; $OR=2.163$, 95% CI : 1.144~4.090)所感染的结核菌更容易成簇;对异烟肼和利福平同时耐药的耐多药结核菌比仅耐一种一线抗结核药物的单耐药菌株更多地表现为成簇(47.2% vs. 15.5%; $OR=4.773$, 95% CI : 2.316~9.837),耐药结核菌株的近期传播呈现以村落为单位的小范围、散发特点。**结论** 华东农村地区人群中存在耐药结核病的近期传播,其主要传播方式可能为村落内偶然接触;耐药结核病的控制需要重点关注中年人群和复治结核病患者。

【关键词】 耐多药结核病;传播;基因型;簇

Molecular-epidemiological study on the transmission of drug resistant tuberculosis and its influencing factors in rural areas of eastern China XU Biao, HU Yi, WANG Wei-bing, JIANG Wei-li. Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: XU Biao, Email: bxu@shmu.edu.cn

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30771843), Shanghai Leading Academic Discipline Project (No. B118) and the National Science and Technology Mega Projects of China (No. 2008ZX10003-010)

【Abstract】 Objective To investigate the contribution of recent transmission in the epidemic of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (*M.TB*) and related factors from biomedical and social-demographic perspectives in the Eastern rural areas of China. **Methods** Identified by proportion method of drug susceptibility test, 223 drug resistant *M.TB* isolates and their hosts were included in the present study. These drug resistant tuberculosis isolates were first genotyped by Mycobacterial Interspersed Repetitive Units (MIRU), and those isolates with identical MIRU genotype were further classified by IS6110 restricted fragment polymorphism (RFLP). ‘Cluster’ was defined as two patients’ *M.TB* isolates harboring the identical MIRU genotype and IS6110-based RFLP pattern simultaneously. Unique strains denoted those with the unparalleled MIRU genotype in the study collection. Socio-demographic and biomedical characteristics of host patients were compared between the clusters and unique groups through univariate and multivariate logistic regression analysis. **Results** Based on the MIRU-IS6110 pattern, there were 52 isolates belonged to the “cluster” group and 171 as the “unique” group. Drug resistant *M.TB* strain isolated from patients at the age of 30–60 year had a higher probability of being clustered, comparing to those from patients below 30 years of age (30.9% vs. 11.9%; $OR=3.297$; 95% CI : 1.169–9.297). Such finding were also seen in the isolates from patients with previous treatment history compared to newly diagnosed

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.05.012

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(2008ZX10003-010)

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院

通信作者:徐飏, Email: bxu@shmu.edu.cn

patients (32.9% vs. 18.4%; $OR=2.163$, 95% CI : 1.144–4.090). The multi-drug resistant *M.TB* strain was found to have been more frequently clustered when comparing to the mono-drug resistant *M.TB* (47.2% vs. 15.5%; $OR=4.773$; 95% CI : 2.316–9.837). The transmission pattern of drug resistant tuberculosis was presented mainly by the sporadic distribution in small group within rural villages. **Conclusion** Transmission of drug-resistant tuberculosis was seen in the population living in the Eastern rural areas of China, and causal contact within villages was considered as the main route of recent transmission. Patients at middle age and having previous tuberculosis treatment history might have increased the risk of transmission by patients with drug resistant tuberculosis.

[Key words] Multi-drug resistant tuberculosis; Transmission; Genotyping; Cluster

耐药结核病(multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB)是指结核病患者感染的结核分枝杆菌(结核菌)体外被证实至少对异烟肼和利福平两种一线抗结核药物耐药。我国是结核病高负担国家,同时也是MDR-TB热点地区^[1]。我国已全面实施“直接督导下的短程化疗(DOTS)”^[2],县级结核病防治所(科)是农村结核病防治的基本医疗服务单位,但由于结核病诊断以痰涂片为依据,限于经济和技术条件,广大农村县级结核病防治机构不能常规开展基于痰培养的细菌学诊断和药物敏感试验,因此,迄今为止对农村人群的耐药结核病传播状况仍不得而知。本研究以江苏和浙江省各一个农业县为研究现场,对两县一年内登记的所有结核病患者进行结核菌细菌学诊断、药物敏感试验和问卷调查,并对分离获得的耐药菌株进行基因分型和分子流行病学研究,以此描述两县耐药结核病患者结核菌分离株的基因型成簇性分布特征,识别耐药菌株的人群间传播及分析人口学特征、社会经济水平和就医行为对耐药结核病传播的影响。

对象与方法

1. 研究现场与对象:本研究采用针对性抽样方法,根据当地结核病报告率,实施DOTS策略的时间,县级结核病防治机构收集、保存、运送痰标本和完成调查的能力以及现场标本运送至研究单位的距离和所需时间,选择浙江省德清县和江苏省灌云县为研究现场。德清县从1994年开始实施DOTS,灌云县则在研究时刚启动DOTS,两县的结核病控制均采用归口管理,即当地所有的结核病患者必须在县结核病防治所进行诊断、治疗和管理。

以德清县和灌云县分别在2004年4月1日至2005年3月31日和2004年6月1日至2005年5月31日在结核病防治所登记的肺结核患者为研究人群,收集痰标本,培养分离结核菌,共从399例培养阳性的菌阳肺结核患者中获得351株。比例法药物敏感试验发现有223株至少对一种一线药物耐药。本研

究以耐药结核菌分离株及其宿主为研究对象进行菌株基因分型和成簇性分析。

2. 研究方法:细菌基因组DNA提取参考文献[3]的方法,采用CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法抽取结核菌全基因组。药物敏感性试验使用直接比例法检测结核菌对链霉素、异烟肼、乙胺丁醇和利福平的敏感性,培养基的最终浓度分别为0.2、40.0、2.0和10.0 mg/L^[4]。阳性结果定义:与无药物的对照比较,含药物培养基至少有1%的结核菌菌落生长;单耐药结核病定义:结核病患者感染的结核菌体外对一种一线抗结核药物(异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇)耐药;MDR-TB定义:结核菌体外被证实至少对异烟肼和利福平耐药;其他耐药结核病定义:除单耐药结核病和MDR-TB以外其他形式的耐药结核病。

3. 结核菌基因分型:联合基因分型可以有效提高结核菌株基因分型的效果^[5],本研究采用以结核菌散在分布重复单位(myco-bacterial interspersed repetitive units, MIRU)和IS6110限制性内切酶片段长度多态性(IS6110 restriction fragment length polymorphism, IS6110-RFLP)基因分型技术。

(1)MIRU分型:对所研究的耐药菌株进行MIRU 12个位点PCR扩增^[6],在琼脂糖凝胶上通过电泳确定扩增产物长度。MIRU 24、26位点由于不同重复单位拷贝数PCR扩增产物长度接近,很难区别,因此对该两位点部分PCR产物进行直接测序,利用Tandem repeat共享软件网上提交结果,在线获得重复单位相关信息。分型结果以12个位点MIRU拷贝数顺序编码表示。

(2)IS6110-RFLP分型:对MIRU基因型相同的菌株进行IS6110-RFLP的二次分型。将DNA基因组进行Pvu II限制性内切酶(由美国NEB公司提供)酶切,采用凝胶电泳将待测核酸片段分离,然后利用Southern blot技术将分离的核酸片段转移到特异的固相支持物上,用标记的核酸探针与固相支持物上的核酸片段进行杂交,最后洗去未杂交的游离探针,用放射自显影等检测方法显示杂交信号。以

NY2560 菌株作为内参照进行标准化比较,使用 Gel Compar 4.6 软件(美国 Applied Maths 公司)分析^[7]。

4. 质量控制:指定 2 名实验员分别独立进行 MIRU 和 IS6110-RFLP 基因分型,复读所有实验结果并双遍录入。

结 果

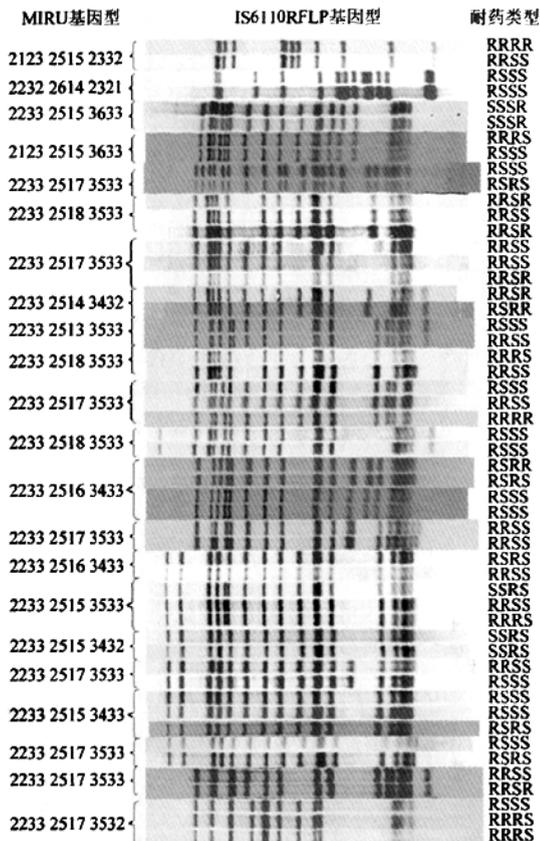
1. 患者基本情况:223 例耐药结核病患者中,男性 152 例(68.6%),平均年龄 52 岁,其中德清县 101 例(45.3%),灌云县 122 例(54.7%)。两地患者在性别、年龄和临床特征(初/复治比例、肺部空洞和药敏试验结果)等方面均衡可比(表 1)。

表 1 德清县和灌云县耐药结核病患者的基本特征比较

变量	德清县(n=101)		灌云县(n=122)		χ ² 值	P 值
	例数	构成比(%)	例数	构成比(%)		
性别						
男性	68	67.3	85	69.7	0.06	0.810
女性	33	32.7	37	30.3		
年龄(岁)						
18~	24	23.8	18	14.8	4.37	0.112
30~	44	43.6	50	41.0		
60~	33	32.7	54	44.3		
治疗史						
初治	67	66.3	80	65.6	0.01	0.91
复治	34	33.7	42	34.3		
痰涂片						
阳性	69	68.3	74	60.7	1.41	0.24
阴性	32	31.7	48	39.3		
肺部空洞						
有	16	15.8	18	14.8	0.05	0.82
无	85	84.2	104	85.2		
药敏结果						
单耐药	59	58.4	70	57.4	3.85	0.15
MDR-TB	19	18.8	34	27.9		
其他耐药	23	22.8	18	14.8		

2. 耐药菌株成簇性分析:耐药菌株采用 MIRU 基因分型。在德清县患者中识别出 63 种基因型,包括 12 个成簇 MIRU 基因型和 51 个惟一基因型;在灌云县患者中识别出 84 种基因型,包括 16 个成簇 MIRU 基因型和 68 个惟一基因型。进一步采用 IS6110-RFLP 从两县 MIRU 成簇基因型菌株中总共识别出 22 种 IS6110 成簇基因型,包含 52 株分离株,这些分离株被定义为 MIRU 和 IS6110 联合基因分型成簇分离株(图 1)。

3. 成簇性耐药菌株的地区人群分布:德清县和灌云县耐药菌株的成簇比例分别为 20.8% 和 25.8%,差异无统计学意义($P=0.4169$)。成簇性耐药菌株的患者在 18~、30~ 和 60~ 岁年龄组分布的比例分



注:药物类型顺序分别为异烟肼、利福平、链霉素和乙胺丁醇;R:耐药,S:敏感

图 1 MIRU-IS6110 成簇结核菌基因型及耐药类型

别为德清县 4.2%、29.5% 和 21.2%,灌云县 22.2%、32.0% 和 20.4%,均呈现倒“V”字分布。另外,成簇菌株在德清县和灌云县男女性分布比例分别为 2:1 和 1.6:1,差异无统计学意义($P=0.4061$)。

4. 影响耐药菌株成簇性分布的因素分析:结核菌成簇性分布提示,在调查对象间存在近期传播。对 52 株成簇株和 171 株非成簇株的单因素分析结果显示,MDR-TB 患者和 30~60 岁年龄组患者感染的结核菌更有可能成簇(表 2)。以 binary logistic 回归分析对象的治疗史、耐药类型、痰涂片结果、年龄和结核病类型对耐药结核病近期传播的影响,调整性别和性别。结果显示,30~60 岁人群相比 18~30 岁的人群更有可能出现结核菌成簇性分布(30~/18~ 岁组:30.9% vs. 11.9%; $OR=3.297$,95% $CI:1.169\sim 9.297$);另外相比单耐药结核菌,耐多药菌株更有可能出现成簇分布(47.2% vs. 15.5%; $OR=4.773$,95% $CI:2.316\sim 9.837$)(表 2)。

表 2 耐药结核病成簇性分布影响因素的单因素和多因素分析

变量	例数	成簇比例(%)	粗 OR 值	调整 OR 值(95%CI)
县别				
德清	101	21(20.8)	-	-
灌云	122	31(25.4)	-	-
性别				
女性	70	19(27.1)	-	-
男性	153	33(21.6)	-	-
年龄(岁)				
18~	42	5(11.9)	1	1
30~	94	29(30.9)	3.302	3.297(1.169~9.297)*
60~	87	18(20.7)	1.930	1.878(0.639~5.517)
治疗史				
初治	147	27(18.4)	1	
复治	76	25(32.9)	2.179	2.163(1.144~4.090)*
痰涂片				
阴性	80	15(18.8)	1	
阳性	143	37(25.9)	1.513	1.547(0.785~3.050)
耐药类型				
单耐药	129	20(15.5)	1	
MDR-TB	53	25(47.2)	4.866	4.773(2.316~9.837)*
其他耐药	41	7(17.1)	1.122	1.141(0.443~2.940)

注:调整 OR 值和 95%CI 来自 binary logistic, 以患者性别和所在县别调整; *P<0.05

5. 耐药菌株的流行病学特点:对成簇性分布的患者开展现场流行病学调查,成簇耐药结核病患者间的流行病学联系依次为:家庭接触、社会交往、潜在流行病学联系和无证据支持流行病学联系。有 2 簇中的 4 例(7.7%)成簇患者被证实为家庭接触,另 3 簇中的 7 例(13.5%)成簇患者有社会交往。接触史调查并没有发现其他患者间有过接触,但依据患者居住的村落位置,有 28 例(53.8%)成簇性患者居住在相同村落,因此被定义为相互之间存在潜在流行病学联系。另有 14 例(26.9%)无证据表明他们互相之间存在任何已知的流行病学联系。

讨 论

长期以来,由于结核病高负担国家缺乏全面开展结核病细菌学诊断的条件,因此,国内外对结核病传播的研究主要局限于三级医院或专科医院的患者人群,而要全面了解该病在人群中的传播,必须在社区人群中识别大多数乃至全部的结核病患者^[8]。作为发展中国家,我国负责常规诊断的县级结核病防治结构缺乏开展菌株分离培养和药物敏感试验的基本设备、技术和人员,尤其是在基础条件落后的农村地区。迄今为止,未见有关农村地区以人群为基础的耐药结核病传播分子流行病学的报道。

我国的结核病控制实行归口管理,农村地区的结核病患者必须在当地结核病防治所进行诊断、治疗和管理。本研究以华东地区 2 个农业县为研究现场,以县结核病防治机构覆盖的人群为对象,采用国际公认的金标准 IS6110-RFLP 分型技术,结合 MIRU 分型技术,开展结核菌基因型的两级分型研究,分析人群为基础的耐药菌株成簇性及其影响因素,并对成簇性患者开展现场流行病学追踪以识别可能存在的传播链。

耐药结核菌成簇率和成簇比例可以反映相应地区的结核病控制效果。本研究发现在德清和灌云县耐药结核病发生传播的主要为 MDR-TB(48.1%),两县人群间的耐药结核病近期传播比例分别为 20.8%和 25.4%,实施 DOTS 时间较长的德清县与刚启动 DOTS 不久的灌云县,在近期传播比例上并无显著差别,提示 DOTS 策略对控制耐药结核病包括 MDR-TB 的传播效果可能十分有限,一些在结核病高负担地区开展的研究也有类似发现^[9,10]。虽然 WHO 倡导的 DOTS 策略可以大大提高结核病的治愈率和发现率,但是却不能有效地阻止 MDR-TB 的传播。在我国农村地区,县级结核病防治机构缺乏识别、诊断和治疗耐药结核病的能力和技术,因此,一旦有耐药结核病发生,就有可能形成人间传播。在我国目前的结核病流行状况下,MDR-TB 无疑已经成为结核病控制中的主要威胁。因此,有必要对 DOTS 策略下的结核病被动发现效果和督导化疗的落实给予更多关注。

患者的年龄可能与结核菌成簇性发生有关,不同年龄组人群中成簇菌株比例呈倒“V”字分布,相对于<30 岁和≥60 岁年龄组,30~60 岁组患者具有较高的成簇危险性。老年人发生结核病更有可能是既往感染潜伏在体内的结核菌被激活的结果^[11-13]。而<60 岁者成簇性的发生却与年龄呈正相关。究其原因,首先是由于结核病在我国流行传播有很长历史,很有可能在农村地区存在某些菌株的地方性流行,随着年龄的增长,研究现场当地居民接触结核菌、感染发病的危险也逐渐增加。其次,在本研究中,30~60 岁年龄组人群痰涂片阳性检出率为 81.9%,明显高于<30 岁(54.8%)和≥60 岁(39.1%)(P=0.0001)人群。提示该人群在感染结核菌后可能有较长时间的传染期,通过同辈接触以及在共同的活动环境下,容易在同一年龄段人群中发生近期传播,形成同源簇。此外,30~60 岁年龄组人群社会经济负担重,机体免疫功能可能受到一定影响,导

致可能在近期感染后发病。

与其他研究不同,本研究未发现男性具有更高的结核菌成簇危险,且女性患者成簇的比例略高于男性,但差异无统计学意义。究其原因可能是因为本研究的农村地区,艾滋病流行率很低,因此并没有出现性别和艾滋病交互作用对于结核病近期感染和传播的影响^[14,15]。而女性成簇比例较高,可能是机遇所致,因为女性患者在结核病尤其是 MDR-TB 人群中所占比例较小^[16]。

利用流行病学追踪随访,在所有成簇性患者中,仅有 21.2% 被证实相互之间有过接触。在被证实有流行病学联系的簇中,家庭成员占 36.4%,其余均为朋友、同事等社会关系。很多研究已经提示,在结核病高发地区,尤其是耐药结核病的传播往往是由于随机接触所致,我们以往的研究结果也支持这一观点^[17,18]。此外,尽管本研究发现的大部分簇中患者并无明确的接触史,但 75% 感染成簇菌株的患者住在同一村,即菌簇主要以村为单位分布,提示患者间可能存在流行病学联系和传播危险性。

本次研究是对我国农村结核病传播模式的一次探索性尝试。研究结果提示,在部分华东农村地区,耐药结核病的流行呈现出菌株近期传播和体内复燃两种机制。30~60 岁年龄组和 MDR-TB 患者所感染的菌株更有可能表现为“成簇”,提示近期传播的危险性。此外,耐药结核病的传播呈现一定的村落聚集性特点。

参 考 文 献

- [1] The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Report No.4. WHO/HTM/TB/2008.394.
- [2] Wang L, Liu J, Chin DP. Progress in tuberculosis control and the evolving public-health system in China. *Lancet*, 2007, 369 (9562):691-696.
- [3] van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, et al. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(11):2578-2586.
- [4] Canetti G, Froman S, Grosset J, et al. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull WHO*, 1963, 29:565-578.
- [5] Hu Y, Jiang WL, Zhao Q, et al. The combined application of multiple methods in identifying genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* strain circulating in rural China. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2009, 32(8):576-580. (in Chinese)
胡屹,蒋伟利,赵琦,等.多种基因分型技术在识别结核分支杆菌基因型的联合应用. *中华结核和呼吸杂志*, 2009, 32(8):576-580.
- [6] Mazars ES, Lesjean AL, Banuls M, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4):1901-1906.
- [7] van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(2):406-409.
- [8] Murray M, Alland D. Methodological problems in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Am J Epidemiol*, 2002, 155(6):565-571.
- [9] Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, et al. The recent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* strains among Iranian and Afghan relapse cases: a DNA-fingerprinting using RFLP and spoligotyping. *BMC Infect Dis*, 2008, 8:109.
- [10] Durmaz R, Zozio T, Gunal S, et al. Population-based molecular epidemiological study of tuberculosis in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(12):4027-4035.
- [11] Alland D, Kalkut GE, Moss AR, et al. Transmission of tuberculosis in New York city. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med*, 1994, 330(24):1710-1716.
- [12] Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med*, 1994, 330(24):1703-1709.
- [13] Yang ZH, de Haas PE, Wachmann CH, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark in 1992. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(8):2077-2081.
- [14] Lockman S, Sheppard JD, Braden CR, et al. Molecular and conventional epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Botswana: a population-based prospective study of 301 pulmonary tuberculosis patients. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3):1042-1047.
- [15] Haas WH, Engelmann G, Anthor B, et al. Transmission dynamics of tuberculosis in a high-incidence country: prospective analysis by PCR DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(12):3975-3979.
- [16] Holmes CB, Hausler H, Nunn P. A review of sex differences in the epidemiology of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, 2(2):96-104.
- [17] Jia ZW, Li XW, Feng D, et al. Transmission models of tuberculosis in heterogeneous population. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(15):1360-1365.
- [18] Chan-Yeung M, Kam KM, Leung CC, et al. Population-based prospective molecular and conventional epidemiological study of tuberculosis in Hong Kong. *Respirology*, 2006, 11(4):442-448.

(收稿日期:2009-10-30)

(本文编辑:张林东)