

DOI:10.13350/j.cjpb.231221

• 临床研究 •

# 贵阳市结核分枝杆菌利福平耐药与相关突变 基因特征分析\*

张蔓娜<sup>1</sup>, 陈秋悦<sup>1</sup>, 万亿<sup>2</sup>, 何云<sup>3</sup>, 沈渡<sup>4</sup>, 杨雪宇<sup>4</sup>, 王倩<sup>1\*\*</sup>(1. 贵阳市公共卫生救治中心结核科, 贵州贵阳 550003; 2. 贵阳市公共卫生救治中心感染科;  
3. 贵阳市公共卫生救治中心麻醉科; 4. 贵州医科大学公共卫生与健康学院)**【摘要】** 目的 分析贵阳市利福平耐药情况与相关突变基因特征, 为控制贵阳市耐利福平结核病提供基础和依据。**方法** 收集贵阳市公共卫生救治中心 2022 年 6 月至 2023 年 6 月疑似结核样本, 采用微阵列基因芯片技术对结核分枝杆菌利福平 rpoB 基因进行检测, 并将药敏试验验证结果于基因芯片法对比。 **结果** 3 081 例阳性标本中, 痰标本 (50.44%) 及纤刷物标本 (34.99%) 占比最多, 387 例为利福平 rpoB 基因突变, 突变率为 12.84% (387/3013), 6 例结果显示其他突变类型, 占全部突变类型的 1.55%。 **结论** 贵阳市地区 rpoB 基因突变率为 12.84% (387/3013), 531 位点 (C→T) 突变率最高, 其次是 511 (T→C) 位点、526 (C→T) 位点, 并且与其他地区存在差异。**【关键词】** 结核病; 结核分枝杆菌; 利福平; 基因芯片**【中图分类号】** R378.91**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2023)12-1470-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1470-1473.]

## Characterization of rifampicin resistance and related mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in Guiyang City

ZHANG Manna<sup>1</sup>, CHEN Qiuyue<sup>1</sup>, WAN Yi<sup>2</sup>, HE Yun<sup>3</sup>, SHEN Du<sup>4</sup>, YANG Xueyu<sup>4</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>

(1. Department of Tuberculosis, Guiyang Public Health Treatment Center, Guiyang 550003, China; 2. Department of Infection, Guiyang Public Health Treatment Center; 3. Department of Anesthesiology, Guiyang Public Health Treatment Center; 4. School of Public Health and Health, Guizhou Medical University)

**【Abstract】** **Objective** To analysis of guiyang rifampicin with genetic mutations associated with drug resistance characteristic of rifampicin resistant TB control guiyang provide foundation and basis. **Methods** Suspected tuberculosis samples were collected from Guiyang Public Health Treatment Center from June 2022 to June 2023. Gene array technology was used to detect the rpoB gene of *Mycobacterium tuberculosis* rifampicin, and the drug sensitivity test verification results were compared with gene chip method. **Results** 3081 cases of positive specimens, the sputum specimens (50.44%) and the fine brush samples (34.99%) than most, 387 cases of rifampicin rpoB gene mutations, mutation rate was 12.84% (387/3013), 6 cases showed other mutations type, accounting for 1.55% of the total mutation types. **Conclusion** The mutation rate of rpoB gene in Guiyang is 12.84% (387/3013). The mutation rate of 531 site (C→T) is the highest, followed by 511 site (T→C) and 526 site (C→T), which is different from other regions.**【Key words】** tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; rifampin; gene chip

\*\*\*结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 感染引起的慢性传染病<sup>[1]</sup>。2022 年全球结核病报告显示, 2021 年全球耐药结核病患者达 45 万例, 比 2020 年 43.7 万例增长了 3.7%, 就耐药结核病例数量而言, 中国也仍是负担最重的 7 个国家之一<sup>[2]</sup>。

目前已经明确 95%~99% 的结核分枝杆菌耐利福平主要是因为 rpoB 基因在 507-533 位密码子共 88 bp 的核心区域内 (rifampicin resistance determining region, RRDR) 碱基发生突变、缺失、颠换等导致的<sup>[3-4]</sup>。在 rpoB 基因突变中, 531 位点最为常见, 但在已有研究中, 各个国家报道的突变率不全相同: 西班牙

(72.3%)<sup>[5]</sup>、缅甸 (63.6%)<sup>[6]</sup> 和孟加拉 (57.4%)<sup>[7]</sup>、新加坡 (54.9%)<sup>[8]</sup>、巴西 (56.1%)<sup>[9]</sup> 等地的 rpoB 基因 531 位点突变率存在较大差异, 可见 rpoB 基因的突变存在明显的地域性差异。

本研究采用微阵列基因芯片技术对结核分枝杆菌利福平 rpoB 基因进行检测, 并将药敏试验验证结果于

\* **【基金项目】** 贵阳市 2022 年度科技计划项目 (筑科合同 [2022]-4-9-1 号)。

\*\* **【通讯作者】** 王倩, E-mail: 327465840@qq.com

**【作者简介】** 张蔓娜 (1982-), 女, 贵州贵阳人, 本科, 副主任医师, 主要研究结核病方向。E-mail: Z179304407@163.com

基因芯片法对比,验证基因芯片结果的一致性与可靠性,尝试分析贵阳市地区 MTB 利福平耐药和相关基因突变特征,为控制贵阳市耐利福平结核病提供基础和依据。

## 材料与方法

### 1 样本来源

收集贵阳市公共卫生救治中心 2022 年 6 月至 2023 年 6 月来自门诊、住院的病人送检样本中经培养或抗酸染色阳性的疑似结核样本,送检样本类型包括痰(含咽拭子)9 884 份、纤刷物 8 539 份、胸水 1 650 份、脑脊液 1572 份、粪便 938 份、尿液 747 份、肺泡灌洗液 722 份及其他类型样本共 25 683 份。

### 2 DNA 提取和 PCR 荧光定量分析

将合格患者标本消化后,使用北京博奥晶典生物技术有限公司生产的分枝杆菌核酸测试剂盒(PCR-荧光探针法)提取标本中的分枝杆菌 DNA 并进行 PCR 荧光定量分析,整个过程严格按照试剂盒说明书及标准操作规程(SOP)操作,以扩增曲线呈 S 型且 CT 值 $<36$  判断为阳性,使用试剂盒自带的阴阳性对照作为质控。所得 DNA 在 $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存备用。

### 3 结核分枝杆菌药物敏感性试验

将部分患者标本消化后培养,并进行改良罗氏比例法药物敏感性试验<sup>[10]</sup>,药物选用利福平(RFP),药物在罗氏(L-J)培养基中的药物终浓度分别为  $40\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。 $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 4 周后观察结果。质控菌株 H37RV 作为全敏感标准菌株。结果判定<sup>[11]</sup>:耐药:(含药培养基上生长菌落数/对照培养基上生长菌落数) $\times 100\% \geq 1\%$ 。

### 4 微阵列基因芯片检测

将所得 MTB 核酸阳性(CT $<32$ )使用博奥生物集团有限公司生产的结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒(DNA 微阵列芯片法)进行检测,按照试剂盒说明进行扩增、杂交、洗涤干燥,最后扫描判读结果,以试剂盒自带的阴阳性对照作为质控,对照结核分枝杆菌利福平相关突变基因 rpoB 各突变位点微阵列图谱报告结果。

### 5 统计学方法

本研究使用 SPSS22.0 统计学软件对数据进行整理,计数资料采用使用 $\chi^2$  检验,使用 Kappa 检验方法检验基因芯片检测结果和药物敏感性试验结果的一致性, $P \leq 0.05$  时具有统计学意义,当  $\text{Kappa} > 0.75$  时说明两者一致性良好, $0.4 \leq \text{Kappa} < 0.7$  表明两者一致性一般, $\text{Kappa} < 0.4$  表明两者一致性差。

## 结 果

### 1 患者一般情况与 MTB 核酸阳性率

患者一般情况:患者来自贵州省贵阳市包括乌当、云岩、南明、花溪、白云、观山湖及三县一市的各个地区及贵州省其他地区,分布范围广泛。年龄范围包括 1 d ~ 99 岁,其中男性患者共 16 182 人次,女性患者共 9 633 人次。

病人一般情况信息与 MTB 核酸结果见表 1。年龄按照国际分段法分为婴幼儿(0~6 岁)、儿童(7~12 岁)、少年(13~17 岁)、青年(18~45 岁)、中年(46~69 岁)、老年(70~)等组,各组间两两分析,婴幼儿、儿童、少年、青年;中年、老年三组间阳性率差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。男性与女性阳性率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 MTB 核酸检测结果与患者一般情况  
Table 1 MTB nucleic acid test results and general information of patients

分组 Group	阳性 Positive	阴性 Negative	合计 Total	阳性率(%) Positive rate	
年龄(岁)	0~6	4	158	162	2.47
	7~12	11	236	247	4.45
	13~17	84	586	670	12.54
	18~45	1172	7542	8714	13.45
	46~69	1332	10221	11553	11.53
	70~	478	3859	4337	11.02
性别	男	1946	14161	16107	12.08
	女	1135	8441	9576	11.85

MTB 核酸 PCR(荧光探针法)检测 25 683 例,其中 3 081 例阳性,阳性率 12.00% (3081/25683) (表 2)。表 2 结果进行统计分析,各类型间阳性率差异具有统计学意义( $\chi^2 = 889.85, P < 0.05$ ),脓分泌物阳性率最高(29.86%),脑脊液阳性率最低(0.13%)。

表 2 MTB 核酸 PCR(荧光探针法)检测结果  
Table 2 Detection results of MTB nucleic acid PCR (fluorescent probe method)

样本类型 Sample type	样本数量 Sample size	构成比(%) N=25683	阳性数量 Positive number	阳性率(%) Positive rate
痰液	9884	38.48	1554	15.72
纤刷物	8539	33.25	1078	12.62
胸水	1650	6.42	40	2.42
脑脊液	1572	6.12	2	0.13
粪便	938	3.65	40	4.26
尿液	856	3.33	31	3.62
肺泡灌洗液	722	2.81	51	7.06
脓分泌物	499	1.94	149	29.86
穿刺物	319	1.24	13	4.08
分泌物	246	0.96	70	28.46
腹水	195	0.76	2	1.03
穿刺液	96	0.37	26	27.08
心包积液	48	0.19	1	2.08
组织液	20	0.08	3	15.00
尿沉渣	12	0.05	2	16.67
其他	87	0.34	17	19.54

## 2 药敏试验与基因芯片检测结果一致性验证

MTB 核酸阳性的 3 081 份样本中,随机选取了 162 份进行药敏试验,其结果与基因芯片法检测结果见表 3。基因芯片检测结果与药敏试验结果间的 Kappa 值为 0.831 大于 0.75,表明基因芯片检测结果与药敏试验结果一致性良好。

表 3 基因芯片检测结果与药敏试验结果对比  
Table 3 Comparison of the results of gene chip detection and drug susceptibility test

基因芯片 Gene chip	药敏试验 Drug susceptibility testing		Kappa
	耐药 Drug-fast	敏感 Sensitivity	
耐药	29	7	0.831
野生型	2	124	

## 3 RIF 耐药与相关基因突变情况

3 081 例阳性标本中,痰标本(50.44%)及纤刷物标本(34.99%)占比最多,各类型标本排除标本量过小的几类标本,总体 rpoB 突变检出率在 5%~17.65% 间,胸水和尿液突变检出率相对较低,脓分泌物与肺泡灌洗液突变检出率较高,见表 4。

表 4 3 081 例阳性标本标本类型情况与各类型标本 rpoB 基因突变检出情况

Table 4 Specimen types of 3 081 positive specimens and rpoB gene mutation detection in each type of specimens

样本类型 Sample type	样本数量 Sample size	构成比 (%) (N=3081)	rpoB 突变 检出数量 No.	突变比例(%) Prominent proportion
痰液	1554	50.44	210	13.51
纤刷物	1078	34.99	115	10.67
脓分泌物	149	4.84	25	16.78
分泌物	70	2.27	9	12.86
肺泡灌洗液	51	1.66	9	17.65
粪便	40	1.30	5	12.50
胸水	40	1.30	2	5.00
尿液	31	1.01	2	6.45
穿刺液	39	1.27	6	15.38
组织液	3	0.10	0	0.00
腹水	2	0.06	0	0.00
脑脊液	2	0.06	1	50.00
其它	22	0.71	3	13.64

将 MTB 核酸阳性的 3 081 例除去同一病人重复检测后共 3 013 例,全部进行微阵列基因芯片检测,结果见表 5。其中 387 例为利福平 rpoB 基因突变,突变率为 12.84%(387/3013),6 例结果显示其他突变类型,占全部突变类型的 1.55%。531 位点(C→T)突变率最高,突变率为 51.42%(199/387),其次是 511(T→C)位点、526(C→T)位点,突变率为 16.02%(62/387)、6.72%(26/387)。

表 5 387 例利福平 rpoB 基因突变类型分布情况

Table 5 Distribution of rpoB gene mutations in 387 cases of rifampicin

突变类型 Mutation type	突变频率 Mutation frequency	突变率(%) Mutation rate
511(T→C)	62	16.02
511(T→G),516(A→G)	1	0.26
513(C→A)	1	0.26
516(A→G)	8	2.07
516(A→T)	11	2.84
516(G→T)	11	2.84
526(A→G)	2	0.52
526(A→T)	10	2.58
526(C→G)	23	5.94
526(C→T)	26	6.72
531(C→G)	5	1.29
531(C→T)	199	51.42
533(T→C)	22	5.68
其他	6	1.55

## 讨论

贵州地区是我国结核病的高发区,贵阳市公共卫生救治中心作为贵阳市感染病和结核病省级重点专科医院,患者数量庞大,标本数量多。本研究从该院的疑似结核标本中,通过核酸检测(PCR-荧光探针法)筛选出 MTB 阳性标本,以微阵列基因芯片法检测 MTB 利福平 rpoB 基因突变情况,3013 例 MTB 阳性标本中 387 例出现利福平 rpoB 基因突变,突变率为 12.84%。rpoB 基因突变主要集中在 507-533 位的利福平耐药决定区(RRDR)<sup>[3-4]</sup>,最常见的是 531 位点和 526 位点,531 位点突变率大于 526 位点,其余位点包括 508 位点、511 位点、513 位点、516 位点、522 位点、526 位点、530 位点、531 位点、533 位点<sup>[12]</sup>。

本研究分析了患者年龄、性别对阳性率的影响,结果得到少年、青年组的阳性率更高,且差异有统计学意义;但性别方面男、女性阳性率差异无统计学意义。本研究使用的微阵列基因芯片法的检测位点包括 511 位点、513 位点、516 位点、526 位点、531 位点、533 位点,检测结果中 531 位点(C→T)突变率最高,突变率为 51.42%(199/387),其次是 511(T→C)位点、526(C→T)位点,突变率为 16.02%(62/387)、6.72%(26/387),为本地区最常见的 3 种类型,与欧维正等<sup>[13]</sup>的研究结果相符,但本研究所得利福平耐药突变率为 12.84%对比本地区曾经报道的利福平耐药突变率下降了 7.32%,526(C→G)位点、533(T→C)位点突变率分别升高 1.02%和 1.11%,出现了小幅上涨,511 位点联合其他位点发生突变的情况也相对减少(9/552→1/387)。同时,本研究将基因芯片结果与“金标准”药敏试验结果进行一致性检验,再一次论证了微阵列基因芯片法在结核分枝杆菌耐药检测方面的可靠性。

各地报道的突变率、突变类型都有所差异,可能与

造成耐药结核病发生的诸多影响因素有关,如人口流动、既往治疗史、经济水平等<sup>[14]</sup>。本研究所得结果与既往结果出现差异可能与研究时纳入样本、医生用药习惯及病人服药情况等因素有关<sup>[15]</sup>。

综上所述,本研究对贵阳市地区结核分枝杆菌利福平耐药情况和相关基因进行了分析,对比同地区的既往研究,发现了利福平耐药基因突变情况的变化趋势,为控制贵阳市耐利福平结核病的流行提供基础和依据。

#### 【参考文献】

[1] Wang ZR, Sun R, Mu C, et al. Characterization of fluoroquinolone-resistant and multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates using whole-genome sequencing in Tianjin, China[J]. Infect Drug Resist, 2022, 15: 1793-1803.

[2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2022 [EB/OL]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.

[3] Khosravi AD, Goodarzi H, Alavi SM. Detection of genomic mutations in KatG, inhA and rpoB genes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates using polymerase chain reaction and multiplex allele-specific polymerase chain reaction[J]. Braz J Infect Dis, 2012, 16(1): 57-62.

[4] Heysell SK, Houpt ER. The future of molecular diagnostics for drug-resistant tuberculosis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(4): 395-405.

[5] Torres MJ, Criado A, Gonzalez N, et al. Rifampin and isoniazid resistance associated mutation in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains in Seville, Spain[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2002, 6(2): 160-163.

[6] Aung WW, Ei PW, Nyunt WW, et al. Phenotypic and genotypic

analysis of anti-tuberculosis drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Myanmar[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(5): 494-499.

[7] Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, et al. Molecular mechanism of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from Bangladesh[J]. Tuberculosis, 2012, 92(6): 529-534.

[8] Lee AS, Lim IH, Tang LL, et al. High frequency of mutations in the rpoB gene in rifampin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Singapore[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(4): 2026-2027.

[9] Valim AR, Rossetti ML, Ribeiro MO, et al. Mutations in the rpoB gene of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(8): 3119-3122.

[10] 欧维正, 骆科文, 王燕, 等. 基因芯片和比例法药物敏感性实验检测结核分枝杆菌对利福平和异烟肼耐药性的比较研究[J]. 检验医学, 2013, 5(28): 404-407

[11] 陈连勇, 茹浩浩, 杨星, 等. 云南省 846 株结核分枝杆菌药敏试验结果[J]. 昆明医科大学学报, 2020, 41(3): 45-49.

[12] 张凌峰, 高梅. 耐多药结核分枝杆菌利福平相关基因 rpoB 突变分析[J]. 当代医学, 2013, 19: 15-16.

[13] 欧维正, 骆科文, 陈峥宏, 等. 贵州地区结核分枝杆菌利福平耐药相关基因 rpoB 突变特征分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, (10): 833-835.

[14] 汤科, 孙宏虎, 郑超, 等. 四川地区利福平耐药结核分枝杆菌 rpoB 基因利福平耐药决定区突变分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2013, 50(2): 399-403.

[15] 高敏, 杨婷婷, 李桂莲, 等. 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[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(5): 770-775.

【收稿日期】 2023-07-26 【修回日期】 2023-10-15

(上接 1469 页)

[6] Hamzan NI, Fauzi FH, Taib H, et al. Simple and rapid detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* by loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Bangladesh J Med Sci, 2018, 17(3): 402-410.

[7] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.

[8] Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting[J]. Am J Infect Control, 2008, 36(5): 309-32.

[9] 王梓晗, 邓剑平, 李淑敏, 等. 缺血性脑卒中患者介入治疗后并发相关性肺炎的病原菌分布及药敏分析[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(3): 486-489.

[10] Westendorp WF, Vermeij JD, Brouwer MC, et al. Pre-stroke use of beta-blockers does not lower post-stroke infection rate: an exploratory analysis of the preventive antibiotics in stroke study [J]. Cerebrovasc Dis, 2020, 42(2): 506-511.

[11] 任贞, 王志强, 王彦阔, 等. 脑卒中患者医院感染病原菌分布及经

济损失分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(2): 324-326.

[12] Henskens LH, Van Oostenbmgge RJ, Kroom AA, et al. Detection of silent cerebrovascular disease refines risk stratification of hypertensive patients[J]. J Hypertens, 2020, 27(4): 846-853.

[13] 潘来生. 某院 80 例脑卒中并发医院感染患者标本中病原菌的分布于耐药性分析[J]. 抗感染药学, 2022, 19(4): 517-520.

[14] 林萍, 付金霞, 张贺男, 等. 脑卒中并发肺炎患者病原菌、危险因素及 T 淋巴细胞水平分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(7): 826-829.

[15] 周小燕, 彭舒, 任丽君. 老年脑卒中患者医院感染病原学及危险因素分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(4): 459-462.

[16] 黄维翠, 李柏新, 刘振宁. 脑卒中后抑郁患者肠道菌群分布及其与血清 IGF-1、BDNF、NGF、hcy 水平的关系[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(11): 1341-1344.

[17] 王红. 脑卒中后肺部感染患者炎症细胞因子、免疫功能变化及影响因素分析[J]. 中国医学创新, 2022, 19(21): 150-153.

【收稿日期】 2023-08-07 【修回日期】 2023-10-30