

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20233193

## 论著·临床微生物与感染监测专题

## 贵州地区 2017—2020 年结核分枝杆菌卷曲霉素耐药与相关基因突变关系

李秋阳<sup>1</sup>, 曾强林<sup>1</sup>, 陈小菊<sup>1</sup>, 陈玲<sup>2</sup>

(1. 成都大学附属医院呼吸与危重症医学科, 四川 成都 610081; 2. 遵义医科大学附属医院呼吸与危重症医学科结核病区, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** 目的 检测结核分枝杆菌(*M. tb*)对卷曲霉素(CM)耐药相关基因突变情况,探究基因型与表型的关联,为临床使用CM提供指导。方法 收集2017—2020年某院痰抗酸染色阳性的肺结核病患者痰标本,培养获得临床分离*M. tb*,药物敏感试验(DST)明确菌株耐药表型;提取DNA送全基因组测序(WGS),检测CM耐药相关基因*tlyA*、*rrs*、*rpsL*、*eis*、Rv0194及Rv1258C的突变情况,探索CM与利福平(RIF)表型耐药相关性。结果 共培养123株*M. tb*,WGS检出6个CM耐药相关基因共23个非同义突变位点;DST结果显示52例RIF耐药,4例CM、RIF均耐药。CM耐药菌株检出*rrs*基因A1401G、*rpsL*基因A128G以及Rv0194基因C3293T和T221C非同义突变位点;CM与RIF耐药相关性分析显示,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 *M. tb* CM耐药可能与*rrs*基因A1401G、*rpsL*基因A128G和Rv0194基因C3293T突变有关,CM存在与RIF交叉耐药可能,在制定抗结核治疗方案时可作参考。

**[关键词]** 卷曲霉素; 耐药结核病; 基因突变; 全基因组测序; *rrs* 基因; *rpsL* 基因

**[中图分类号]** R521

## Relationship between capreomycin resistance and related gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in Guizhou from 2017 to 2020

LI Qiu-yang<sup>1</sup>, ZENG Qiang-lin<sup>1</sup>, CHEN Xiao-ju<sup>1</sup>, CHEN Ling<sup>2</sup> (1. Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China; 2. Tuberculosis Division, Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

**[Abstract]** **Objective** To detect the mutations of capreomycin (CM) resistance related genes of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*), explore the relationship between genotype and phenotype, and provide guidance for the clinical use of CM. **Methods** Sputum specimens of tuberculosis patients with positive acid-fast staining in a hospital from 2017 to 2020 were collected, from which *M. tb* strains were clinically isolated. Drug resistance phenotypes of the strains were identified through drug susceptibility testing (DST). DNA was extracted and underwent whole-genome sequencing (WGS) to detect mutations of CM-resistance-related genes *tlyA*, *rrs*, *rpsL*, *eis*, Rv0194 and Rv1258C. Relationship between CM and rifampicin (RIF) phenotypic resistance was explored. **Results** 123 *M. tb* strains were isolated, out of which 23 nonsynonymous mutation sites in 6 CM resistance-related genes were detected via WGS. DST showed that 52 strains were resistant to RIF and 4 strains were resistant to both CM and RIF. Nonsynonymous mutation sites (A1401G in *rrs*, A128G in *rpsL*, C3293T and T221C in Rv0194) were detected in CM-resistant strains. Correlation between CM and RIF resistance was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CM resistance of *M. tb* may be related to the mutations of *rrs* gene A1401G, *rpsL* gene A128G and Rv0194 gene C3293T, and there may be cross resistance between CM and RIF, which can be used as a reference in formulating

[收稿日期] 2022-08-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81760003)

[作者简介] 李秋阳(1993-),女(汉族),四川省洪雅县人,医师,主要从事肺部感染研究。

[通信作者] 陈玲 E-mail: Lingjunced@163.com

anti-tuberculosis treatment plan.

**[Key words]** capreomycin; drug-resistant tuberculosis; gene mutation; whole-genome sequencing; *rrs* gene; *rpsL* gene

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*) 感染引起的慢性传染病<sup>[1]</sup>。由于各种因素,目前已产生耐药性 TB。2020 年世界卫生组织 (WHO) TB 年报<sup>[1-2]</sup> 报道,耐药 TB 具有死亡率高、治疗方案不足和诊断易被延误的特点,患者数量有增多趋势。耐药 TB 的出现对全球 TB 控制提出了挑战<sup>[3]</sup>。

耐多药结核病 (multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB) 指 TB 患者感染的 *M. tb* 体外被证实至少对异烟肼、利福平 (rifampicin, RIF) 耐药。卷曲霉素 (capreomycin, CM) 可应用于 MDR-TB 患者强化期治疗中<sup>[4]</sup>,但因 *M. tb* 对 CM 和其他已产生耐药的抗结核药物存在交叉耐药可能<sup>[5]</sup>,故使用 CM 抗结核前对 TB 患者进行耐药筛查尤为必要。

研究<sup>[6]</sup> 结果表明,CM 治疗 MDR-TB 效果显著。目前认为 CM 通过改变 *M. tb* 核糖体蛋白的功能抑制 *M. tb* 蛋白质的合成<sup>[7-8]</sup>。*M. tb* 分离株对包括 CM 在内的抗结核药物的耐药性基本上是由特定基因靶点的自变点突变造成的<sup>[9-12]</sup>。多项研究表明,*rpsL*<sup>[13]</sup>、*tlyA*<sup>[8,14]</sup>、*rrs*<sup>[2,5]</sup>、*eis*<sup>[12]</sup>、*Rv0194*<sup>[12]</sup> 及 *Rv1258C* 基因<sup>[15]</sup> 为最主要的 CM 耐药相关基因,但它们的突变是否与 CM 耐药相关仍存在争议<sup>[16]</sup>。目前大多数研究仅针对单个 CM 耐药相关基因,缺乏对以上 6 个基因的同时分析,且多使用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增相应基因,过程中难免会造成基因突变带来误差,从而影响实验结果。全基因组测序可避免上述问题,也有利于建立完整全基因组测序数据库,便于开展后续试验。此外,RIF 作为一线抗结核药物代表,临床使用频繁,分析 CM 耐药与 RIF 耐药是否存在关联,有利于评估 CM 是否适用于利福平耐药结核病 (rifampicin-resistant tuberculosis, RR-TB) 患者抗结核治疗。

本研究拟对 *M. tb* 菌株做药物敏感试验 (drug susceptibility test, DST),并提取菌株 DNA 行全基因组测序 (whole-genome sequencing, WGS),检测上述 6 个 CM 耐药相关基因的突变情况,探究 CM 耐药基因型与表型的关系,以及 CM 耐药与 RIF 耐药的关联。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株来源 *M. tb* 标准菌株 H37Rv,由贵州省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 痰标本来源 收集 2017—2020 年遵义医科大学附属医院痰抗酸染色阳性的肺结核病患者痰标本。

1.1.3 主要试剂与仪器 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB, 中国天津市大茂化学试剂厂)、蛋白酶 K (天根生化科技有限公司)、溶菌酶 (Sanland-chem International Inc 公司)、1 000 bp DNA ladder (康为世纪公司)、PCR Mix (结核分枝杆菌菌型分析试剂盒,北京康为世纪公司)、普通梯度 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)、电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)、凝胶成相系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 *M. tb* 临床分离菌株的提取 取 1~2 mL 氢氧化钠预处理后的临床痰标本接种在 2 管酸性培养管斜面上,37℃ 恒温培养箱培养,按时间表观察生长情况,提取阳性培养管中菌株并鉴定菌型。

1.2.2 固体比例法检测 *M. tb* 临床分离株药物敏感性 对 *M. tb* 临床分离株进行抗结核一线和二线药的 DST。(1) 制备改良罗氏 (L-J) 培养基:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.4 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.24 g、柠檬酸镁 0.6 g、谷氨酸钠 7.2 g、丙三醇 12 mL、蒸馏水 600 mL。(2) 制备含药培养基: L-J 培养基中分别加入表 1 所示滤菌后的药剂至其对应含药终浓度。(3) 菌液制备: 在 1 支 5 mL 超声分散管和 2 支离心管中各加入 2、1、1 mL 的 0.5% 吐温-80 生理盐水;挑取培养物放入超声分散管,超声分散 20 s,后加入 0.5% 吐温-80 生理盐水至浓度为 1 mg/mL;吸取 10  $\mu\text{L}$  菌液 (浓度 1 mg/mL) 加入离心管内,得到浓度为  $10^{-2}$  mg/mL 菌液,再取 10  $\mu\text{L}$  菌液 (浓度为  $10^{-2}$  mg/mL) 加入到另 1 支离心管内,得到浓度为  $10^{-4}$  mg/mL 菌液。(4) 接种及培养。每株菌株各取  $10^{-2}$ 、 $10^{-4}$  mg/mL 菌液 10  $\mu\text{L}$  接种在 4 个 L-J 培养基上,对照组、含药物试验组各 2 个,放入 37℃ 培养箱 1 个月观察菌落生长情况。(5) 根据菌落生

长及耐药百分比判断药物敏感试验结果。

表 1 含药培养基药物浓度

Table 1 Drug concentration of medicated medium

药物名称	所用溶剂	药剂储存浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	培养基含药终浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
噻吩-2-羧酸肟(TCH)	dH <sub>2</sub> O	500	5.0
对硝基苯甲酸(PNB)	DMF	500	0.5
链霉素(SM)	dH <sub>2</sub> O	800	4.0
卡那霉素(KAN)	dH <sub>2</sub> O	3 000	30.0
阿米卡星(AMK)	dH <sub>2</sub> O	3 000	30.0
卷曲霉素(CM)	dH <sub>2</sub> O	4 000	40.0
莫西沙星(MFX)	dH <sub>2</sub> O	1 000	2.0
左氧氟沙星(LFX)	dH <sub>2</sub> O	1 000	2.0
加替沙星(GFX)	dH <sub>2</sub> O	1 000	2.0
利福平(RIF)	DMF	4 000	40.0
异烟肼(INH)	dH <sub>2</sub> O	200	0.2
乙胺丁醇(EMB)	dH <sub>2</sub> O	1 000	2.0
对氨基水杨酸钠(PAS)	dH <sub>2</sub> O	1 000	1.0
丙硫异烟胺(PTO)	DMF	4 000	40.0

注: DMF 为二甲基酰胺。

1.2.3 *M. tb* DNA 的提取与菌株鉴定 (1)取培养管内 *M. tb* 菌落置于加有 400  $\mu\text{L}$  1 $\times$  TE 溶液的 EP 管中, 80 $^{\circ}\text{C}$  水浴箱水浴 30 min 后加入 20  $\mu\text{L}$  溶菌酶溶液 (50 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴箱中放置 > 2 h。CTAB 法提取 DNA 作为 PCR 和 WGS 的 DNA 模板, -20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。(2)针对人型结核分枝杆菌特异性序列设计引物 mtb1 (5'  $\rightarrow$  3': ATAGGGAAT-GCTCGCAAC) 和 mtb2 (5'  $\rightarrow$  3': CAACATC-GACGCAGTACCC), 根据结核分枝杆菌复合群特异性序列 IS6110 设计引物 IS6110-P1 (5'  $\rightarrow$  3': TCAGGTCGAGTACGCCTTCT) 和 IS6110-P2 (5'  $\rightarrow$  3': CGTCGCAGAGATCCGCGGTC), 使用 *M. tb* PCR Mix 扩增, 产物分别为 361、850 bp 两条片段, 可鉴定为人型 *M. tb*。

上述试验步骤均在遵义医科大学附属医院呼吸医学实验室的微生物实验室及二级生物安全柜中进行, 试验前后均消毒。

1.2.4 判断标准 多耐药、耐多药 (multidrug-resistance, MDR)、泛耐药 (extensively drug resis-

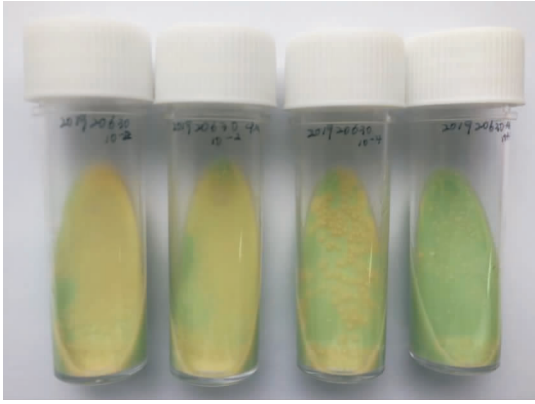
tance, XDR) 判断标准参照文献 [1]。

1.2.5 WGS (1)DNA 模板外送北京邦莱生物科技有限公司进行 WGS, 使用 illumina 二代测序平台, CTAB 法提取的 *M. tb* 基因组 DNA 作为模板进行 DNA 片段文库构建, 双侧测序 (Paired-end Sequencing), 按照每样本 200 倍 *M. tb* 基因组的测序深度上机 (约获得 1 G 数据/样本), 过滤掉接头 (adapter) 和索引 (index) 序列后得到约 150 bp 读长 (reads) 的序列。(2)数据质控: Trimmomatic 软件过滤掉 WGS 原始 Fastq 文件中低质量 reads; 剩余所有 reads 与 *M. tb* 标准菌株 H37Rv (GenBank AL123456) 基因组比对, 通过 MTBseq 流程 ([https://github.com/ngs-fzb/MTBseq\\_source](https://github.com/ngs-fzb/MTBseq_source)) 分析 *M. tb* 基因组数据覆盖中位数 (coverage median), coverage median  $\leq$  30 的数据排除分析。(3)提取单核苷酸多态性 (SNP) 序列: 应用 ubuntu (illumina) 系统, Picard-tools、BWA、GenomeAnalysis、samtools 等软件处理上一步骤获得的数据, 提取试验菌株全基因组中的 SNP 序列。(4)检测突变点: SNP 序列同标准菌株比对, 检测 CM 耐药相关基因 *tlyA*、*rrs*、*rpsL*、*eis*、Rv0194 及 Rv1258C 序列内的突变位点。(5)突变类型: NCBI 网站比对突变位点所在的读码框, 明确突变类型。(6)确认新突变: BLAST 比对检测到的基因突变与数据库已有数据, 明确该突变是否已被发现。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 23.0 软件对数据进行整理分析, 采用卡方检验分析 CM 耐药与 RIF 表型耐药是否存在关联, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 菌株培养分离及 DST 结果 共培养 123 株 *M. tb* 临床分离菌株, 其中, 对抗结核一线和二线药全敏感 68 株, 耐药 55 株。耐药菌株中, 单耐利福平 (rifampicin-resistant, RR) 2 株, 多耐药 4 株, MDR 49 株, 含 6 株 XDR。123 株菌株中, 6 株 CM DST 失败, CM 敏感 113 株, CM 耐药 4 株, 且均为 MDR (含 1 株 XDR), RIF 耐药 52 株 (2 株 RR、1 株多耐药、49 株 MDR, MDR 中含 6 株 XDR)。CM 耐药菌株 DST 结果见图 1。



注:从左向右分别是  $10^{-2}$  mg/mL 对照组、 $10^{-2}$  mg/mL 含 CM 药物组、 $10^{-4}$  mg/mL 对照组、 $10^{-4}$  mg/mL 含 CM 药物组。

图 1 固体比例法检测 *M. tb* 菌株 DST 结果图

Figure 1 Drug susceptibility test results of *M. tb* detected by solid culture proportion method

2.2 菌株 CM 耐药相关基因突变情况与对应耐药表型 WGS 数据显示,所有菌株均检出 *tlyA* 基因 A33G 同义突变及 Rv0194 基因 T221C 非同义突变;Rv0194 基因 C3293T 非同义突变在 77 株菌株中检出,CM 耐药菌株中均检出;*rpsL* 基因 A128G 非同义突变的菌株(16.3%,20/123)中 CM 耐药 3 株,CM 敏感 14 株,其余 CM 的 DST 失败;*rrs* 基因 A1401G 突变菌株(1.6%,2/123)均对 CM 耐药;*rrs* 基因 A908C、*rpsL* 基因 A263C、Rv1258C 基因 C1065T 及 Rv0194 基因 C1810T 突变的菌株 CM 的 DST 失败;其余 28 种突变类型的菌株均对 CM 敏感。见表 2。

表 2 123 株 *M. tb* 菌株突变位点、CM 药敏信息及文献报道情况

Table 2 Mutation sites, CM drug susceptibility information and literature reports of 123 *M. tb* strains

基因	突变位点	密码子变化	氨基酸变化	株数 (n = 123, %)	CM 耐药菌株(株) (n = 4)	CM 敏感菌株(株) (n = 113)	文献
<i>rrs</i>	G5T	-	-	2(1.6)	0	2	无
	A514C	-	-	5(4.1)	0	5	[2]
	A908C	-	-	2(1.6)	0	0	[17]
	C1236T	-	-	1(0.8)	0	1	无
	A1356G	-	-	1(0.8)	0	1	无
	A1401G	-	-	2(1.6)	2	0	[5]
<i>tlyA</i>	A33G	CTA→CTG	Leu11Leu	123(100)	4	113	[16]
	C86T	GCC→GTC	Ala29Val	1(0.8)	0	1	[16]
	C582G	CCC→CCG	Pro194Pro	1(0.8)	0	1	无
<i>eis</i>	G11A	ACC→ATC	Thr4Ile	1(0.8)	0	1	无
	T501G	AGA→AGC	Arg167Ser	1(0.8)	0	1	无
	C1122T	CGG→CGA	Arg374Arg	2(1.6)	0	2	无
<i>rpsL</i>	A128G	AAG→AGG	Lys43Arg	20(16.3)	3	14	[5]
	A263G	AAG→AGG	Lys88Arg	6(4.9)	0	6	[5]
	A263C	AAG→ACG	Lys88Thr	1(0.8)	0	0	[18]
Rv1258C	C55T	GCG→ACG	Ala19Thr	1(0.8)	0	1	无
	C57T	GCG→GCA	Ala19Ala	1(0.8)	0	1	无
	C322T	GTA→ATA	Val108Ile	1(0.8)	0	1	无
	C633T	GGG→AGG	Gly211Arg	1(0.8)	0	1	无
	C1065T	CTG→CTA	Leu355Leu	2(1.6)	0	0	无
	G1240A	CCC→TCC	Pro414Ser	1(0.8)	0	1	#

续表 2 (Table 2, Continued)

基因	突变位点	密码子变化	氨基酸变化	株数 (n = 123, %)	CM 耐药菌株 (株) (n = 4)	CM 敏感菌株 (株) (n = 113)	文献
Rv0194	C93T	ACC→ACT	Thr31Thr	1(0.8)	0	1	无
	T211C	ATG→ACG	Met74Thr	123(100)	4	113	#
	C292G	CAG→GAG	Gln98Glu	1(0.8)	0	1	无
	A571G	AAG→GAG	Lys191Glu	1(0.8)	0	1	无
	C633G	TTC→TTG	Phe211Trp	1(0.8)	0	1	无
	C661A	CTG→ATG	Leu221Met	1(0.8)	0	1	无
	C752A	GCG→GAG	Ala251Glu	1(0.8)	0	1	无
	A1384G	ACG→GCG	Thr355Ala	4(3.3)	0	4	#
	C1810T	CCC→TCC	Pro604Ser	1(0.8)	0	0	无
	C1985T	TCG→TTG	Ser622Leu	1(0.8)	0	1	无
	C2308T	CTG→TTG	Leu770Leu	1(0.8)	0	1	无
	T2575C	TGC→CGC	Cys859Arg	1(0.8)	0	1	无
	G2814A	TTG→TTA	Leu938Leu	1(0.8)	0	1	无
	A3133G	ACC→GCC	Thr1045Ala	1(0.8)	0	1	无
	C3293T	CCC→CTC	Pro1098Leu	77(62.6)	4	73	#
	T3395A	TTG→ATG	Leu1132*	1(0.8)	0	1	无

注:Leu(亮氨酸),Ala(丙氨酸),Val(缬氨酸),Pro(脯氨酸),Thr(苏氨酸),Ile(异亮氨酸),Arg(精氨酸),Ser(丝氨酸),Lys(赖氨酸),Gly(甘氨酸),Met(甲硫氨酸),Gln(谷氨酰胺),Glu(谷氨酸),Phe(苯丙氨酸),Trp(色氨酸),Cys(半胱氨酸);#代表该基因突变已上传 BLAST 数据库,但目前尚未发表;-代表 *rrs* 基因编码 16S rRNA,不编码蛋白质,无相应的密码子、氨基酸;\*代表终止密码子。

2.3 CM 耐药菌株基因突变情况统计 2 株 CM 耐药菌株 *rrs* 基因 A1401G 突变,3 株 CM 耐药菌株 *rpsL* 基因 A128G 非同义突变,4 株 CM 耐药菌株均检出 Rv0194 基因 C3293T、T221C 非同义突变及 *tlyA* 基因 A33G 同义突变。见表 3。

表 3 CM 耐药菌株基因型和表型比对

Table 3 Comparison of the genotypes and phenotypes of CM-resistant strains

基因型	CM 耐药菌株 (n = 4)				CM 敏感菌株数 (n = 113)
	菌株 1	菌株 2	菌株 3	菌株 4	
<i>rrs</i> A1401G	-	+	+	-	0
<i>rpsL</i> A128G	-	+	+	+	14
Rv0194 C3293T	+	+	+	+	73
Rv0194 T221C	+	+	+	+	113
<i>tlyA</i> A33G	+	+	+	+	113

注: + 代表检测到基因突变;- 代表未检测到基因突变。

2.4 CM 与 RIF 表型耐药相关性分析 CM 耐药菌株均为 RIF 耐药,CM 与 RIF 表型耐药比较(采用 Fisher 确切概率法),差异具有统计学意义(列联系数  $r = 0.228, P = 0.022$ )。见表 4。

表 4 CM 与 RIF 耐药表型相关性分析(株)

Table 4 Correlation analysis of drug resistance phenotypes between CM and RIF (No. of isolates)

耐药表型	CM	
	耐药株	敏感株
RIF 耐药株	4	42
RIF 敏感株	0	71

### 3 讨论

贵州地区为我国 TB 高发地区,遵义医科大学附属医院为大型三甲综合医院,患者数量大,标本数量多。本研究对分离自该院的 123 株 *M. tb* 进行抗结核药物的 DST,其中 6 株 CM DST 失败,CM 敏感 113 株,CM 耐药 4 株;RIF 敏感 71 株,RIF 耐药 52 株。WGS 共检测到 *rrs* 基因 6 个突变,*rpsL*、Rv0194、*eis*、*tlyA* 和 Rv1258C 基因的 8 个同义突变和 23 个非同义突变。13 株菌(10.6%)检出 *rrs* 基因 6 个不同的突变位点,其中 A1401G 基因突变率为 1.6%(2/123),与既往研究<sup>[19]</sup>数据相符。其余 5

个 CM 耐药相关基因非同义突变情况如下:20 株 (16.3%) 菌株 *rpsL* 基因 A128G 突变,6 株 (4.9%) A263G 突变, *tlyA* 基因 C86T 突变, *eis* 基因 G11A 和 T501G 突变, *rpsL* 基因 A263C 突变菌株各 1 株 (0.81%)。 *rpsL* 基因整体突变情况与既往研究<sup>[13,18]</sup> 一致。检出 Rv1258C 基因 C55T、C322T、C633T 和 G1240A 突变各 1 株 (0.81%), 分布于 4 株不同的菌株中;所有菌株均检出 Rv0194 基因 T221C 突变, 77 株 (62.6%) 发生 C3293T 突变, 4 株 (3.3%) 发生 A1384G 突变, 其余 C292G、A571G、C633G、C661A、C752A、C1810T、C1985T、T2575C、A3133G 和 T3395A 突变各 1 株 (0.81%)。除上述报道过的基因突变, 本研究首次发现 *eis* 基因非同义突变, Rv1258C 基因 C55T、C322T 和 C633T 突变, Rv0194 基因 C292G、A3133G、T2575C、C661A、C1810T、T3395A、A571G、C752A、C1985T 和 C633G 突变, 以及 *rrs* 基因 A1356G、C1236T、G5T 突变。

CM 耐药菌株中 *rrs* 基因 A1401G、*rpsL* 基因 A128G、Rv0194 基因 C3293T 和 T221C 突变。 *rrs* 基因 A1401G 突变仅在 CM 耐药菌株中检出, 提示该突变类型可能与 CM 耐药存在联系, 与多项研究<sup>[2,5,19]</sup> 结果一致, 且该突变位点可能也与卡那霉素、阿米卡星耐药相关, 可作为潜在预测 CM、卡那霉素、阿米卡星耐药的靶点<sup>[2,5]</sup>。所有 CM 耐药菌株和部分 CM 敏感菌株检出 Rv0194 基因 C3293T, 提示该突变可能与 CM 耐药相关, 但还需明确该突变在 CM 敏感菌株发生后未导致耐药产生的机制。 *rpsL* 基因 A128G 突变虽然只在 CM 敏感菌株中检出, 但 Zhao 等<sup>[13]</sup> 研究支持该突变位点与 CM 耐药可能存在关联, 并可能为二线氨基糖苷类耐药相关的交叉耐药靶点; Rv0194 基因 T221C 突变在所有菌株中均检出, 暂不考虑与 CM 耐药有关; *tlyA* 基因 A33G 为同义突变, 考虑与 CM 耐药无关; 其他基因突变均在 CM 敏感菌株中检出, 考虑为基因多态性, 暂考虑与 CM 耐药无关联。综上所述, 本研究推断 CM 耐药可能与 *rrs* 基因 A1401G、*rpsL* 基因 A128G 和 Rv0194 基因 C3293T 突变存在一定关联, 以上基因突变可作为 CM 耐药监测靶点, 但不能排除作为其他抗结核药物交叉耐药靶点的可能<sup>[20]</sup>, 临床工作者在制定抗结核治疗方案时可作参考。此外, 本研究还发现了若干未报道过的基因位点突变, 但尚未发现这些突变与 CM 耐药相关, 推测可能为基因多态性, 需进一步验证。

RIF 为一线抗结核药物, 然而目前临床已出现大量 RR-TB 患者, CM 与 RIF 耐药相关性分析有助于 CM 耐药筛查及 RR-TB 患者用药指导。本研究中 *M. tb* 临床分离菌株 CM 及 RIF 的 DST 结果统计分析表明, CM 表型耐药与 RIF 表型耐药存在相关性, 但关联程度一般, 且本研究中 CM 耐药菌株仅 4 株, 样本量偏少, 不足以证实 RR-TB 患者对 CM 耐药, 缺乏临床用药指导意义, 后续还需加大样本量探究 CM 与 RIF 耐药相关性。CM 耐药机制方面, 本研究仅针对 6 个报道过的耐药相关基因进行研究, 未深入了解这些基因作为其他一、二线抗结核药物交叉耐药靶点的可能, 可在后续研究中进一步探讨。此外, 还可从功能变异的替代形式, 如大缺失和其他功能丧失突变导致 CM 耐药方面展开研究<sup>[21]</sup>。

本研究对 123 株 *M. tb* 临床分离菌株进行 CM 表型与基因型, 以及 CM 和 RIF DST 的对比分析, 证实菌株存在对 CM 和其他抗结核药物交叉耐药可能, 临床工作者在制定抗结核治疗方案时可作参考。后续研究需进一步明确 CM 耐药机制, 以及 CM 与其他抗结核药物是否存在交叉耐药。

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 2020 [EB/OL]. (2020-10-15)[2022-07-22]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>.
- [2] 冉燕, 赵建军, 张建勇, 等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术及环介导等温扩增技术在结核性脑膜炎的诊断价值[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(24): 3416-3419.  
Ran Y, Zhao JJ, Zhang JY, et al. The diagnostic value of GeneXpert MTB/RIF and LAMP in tuberculous meningitis [J]. The Journal of Practical Medicine, 2020, 36(24): 3416-3419.
- [3] 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.
- [4] World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update [EB/OL]. (2016-09-16)[2022-07-22]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549639>.
- [5] Wang LQ, Yang JH, Chen L, et al. Whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for prediction of drug resistance[J]. Epidemiol Infect, 2022, 150: e22.
- [6] Shao ZT, Tai WT, Qiu YS, et al. Spray-dried powder formu-

- lation of capreomycin designed for inhaled tuberculosis therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(12): 2044.
- [7] Miryala SK, Anbarasu A, Ramaiah S. Impact of bedaquiline and capreomycin on the gene expression patterns of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain and understanding the molecular mechanism of antibiotic resistance[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14499 - 14509.
- [8] Ali W, Jamal S, Grover A, et al. Insights into the mutations leading to capreomycin resistance in S-adenosyl-L-methionine binding motif in TlyA from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2021; 1 - 9. DOI: 10.1080/07391102.2021.1969284. Epub ahead of print.
- [9] Mbelele PM, Utpatel C, Sauli E, et al. Whole genome sequencing-based drug resistance predictions of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tanzania[J]. *JAC Antimicrob Resist*, 2022, 4(2): dlac042.
- [10] Hameed HMA, Islam MM, Chhotaray C, et al. Molecular targets related drug resistance mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR- *Mycobacterium tuberculosis* strains[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 114.
- [11] Dookie N, Rambaran S, Padayatchi N, et al. Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(5): 1138 - 1151.
- [12] 李秋阳, 陈玲. 卷曲霉素治疗耐药结核病作用机制、毒副作用及耐药机制的研究进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019, 27(11): 107 - 110.
- Li QY, Chen L. Research progress on action mechanism, toxic and side effects, and resistance mechanism of capreomycin in the treatment of drug resistant tuberculosis[J]. *Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease*, 2019, 27(11): 107 - 110.
- [13] Zhao J, Wei WJ, Yan HM, et al. Assessing capreomycin resistance on tlyA deficient and point mutation (G695A) *Mycobacterium tuberculosis* strains using multi-omics analysis[J]. *Int J Med Microbiol*, 2019, 309(7): 151323.
- [14] Laughlin ZT, Nandi S, Dey D, et al. 50S subunit recognition and modification by the *Mycobacterium tuberculosis* ribosomal RNA methyltransferase TlyA[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(14): e2120352119.
- [15] Jia HB, Chu HQ, Dai GM, et al. Rv1258c acts as a drug efflux pump and growth controlling factor in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2022, 133: 102172.
- [16] 官政燕, 刘梅, 陈玲. 卷曲霉素抗结核作用及耐药机制的研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(8): 763 - 768, 773.
- Guan ZY, Liu M, Chen L. Advances in research of capreomycin on anti-tuberculosis effect and drug resistance mechanism [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2019, 35(8): 763 - 768, 773.
- [17] Eilertson B, Maruri F, Blackman A, et al. A novel resistance mutation in eccC5 of the ESX-5 secretion system confers ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(9): 2419 - 2427.
- [18] Sheen P, Requena D, Gushiken E, et al. A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 769.
- [19] Varghese B, Al-Hajj S. First insight into the fluoroquinolone and aminoglycoside resistance of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2017, 96(5): 1066 - 1070.
- [20] 梅金周, 王云霞, 张梅娟, 等. 基于全基因组测序的宝安区耐药肺结核菌株基因突变及其特征分析[J]. *现代预防医学*, 2021, 48(23): 4345 - 4348.
- Mei JZ, Wang YX, Zhang MJ, et al. Analysis on genetic mutations and characteristics of drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* based on whole-genome sequencing in Bao'an district[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2021, 48(23): 4345 - 4348.
- [21] Gomes LC, Campino S, Marinho CRF, et al. Whole genome sequencing reveals large deletions and other loss of function mutations in *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance genes [J]. *Microb Genom*, 2021, 7(12): 000724.

(本文编辑:翟若南、左双燕)

**本文引用格式:**李秋阳,曾强林,陈小菊,等. 贵州地区 2017—2020 年结核分枝杆菌卷曲霉素耐药与相关基因突变关系[J]. *中国感染控制杂志*, 2023, 22(1): 7 - 13. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233193.

**Cite this article as:** LI Qiu-yang, ZENG Qiang-lin, CHEN Xiao-jv, et al. Relationship between capreomycin resistance and related gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis* in Guizhou from 2017 to 2020[J]. *Chin J Infect Control*, 2023, 22(1): 7 - 13. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20233193.