文章编号:1000-5404(2010)23-2545-04

论著

结核分枝杆菌北京基因型菌株与重庆地区结核患儿耐药表型的相关分析

彭 哲,朱朝敏,幸琳琳,刘芮汐 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院感染消化科)

【摘要】 目的 研究结核分枝杆菌北京基因型菌株与结核患儿耐药表型及其相关因素。方法 采用定向缺失多重酶链聚合反应技术(deletion-targeted multiplex PCR,DTM-PCR)对从143例患儿分离得到的结核分枝杆菌进行北京基因型菌株鉴定,并使用绝对浓度法进行药敏实验。收集患者的性别、年龄、居住地、卡介苗接种史和结核性脑膜炎病史等相关因素资料。采用χ^2检验和Fisher确切概率法分析北京基因型与相关因素以及耐药表型之间的关系。结果 在143株结核分枝杆菌中,91株为北京基因型,占63.6%,北京基因型菌株与年龄、性别、居住地、卡介苗接种和结核性脑膜炎无关($P>0.05$)。北京基因型菌株在耐链霉素菌株(16.5%,15/91)和耐异烟肼菌株(15.4%,14/91)中的比例显著高于非北京基因型(3.8%,2/52;3.8%,2/52)($P<0.05$)。结论 北京基因型菌株是重庆地区儿童结核患者中流行的优势菌群,患儿的年龄、性别、居住地、是否接种卡介苗和是否为结核性脑膜炎与北京基因型菌株无关,感染北京基因型菌株的结核患儿更易出现链霉素和异烟肼耐药。

【关键词】 结核分枝杆菌;耐药性;基因分型;北京家族基因型
【中图法分类号】 R372;R378.911;R394.3 **【文献标志码】** A

Correlation between Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* and drug-resistant phenotypes in Chongqing children with tuberculosis

Peng Zhe, Zhu Chaomin, Xing Linlin, Liu Ruixi (Department of Infectious Diseases and Gastroenterology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To study the correlation between Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance phenotypes in children with tuberculosis. Methods Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* were detected in 143 children with tuberculosis by deletion-target multiple PCR (DTM-PCR). Drug susceptibility testing was performed using the absolute concentration method. Data about the children with tuberculosis were collected, including their age, sex, residence, BCG vaccination and tuberculous meningitis. Correlation between Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis*, drug-resistance phenotypes and related factors were analyzed by Chi-square test and Fisher's exact test, respectively. Results Of the 143 clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, 91 (63.6%) were Beijing genotype strains. Beijing genotype strains were not correlated with the age, sex, residence, BCG vaccination and tuberculous meningitis ($P>0.05$). The percentage of isoniazid-resistant isolates (15.4%, 14/91) and streptomycin-resistant isolates (16.5%, 15/91) was significantly higher in Beijing genotype strains than in non-Beijing genotype strains (3.8%, 2/52; 3.8%, 2/52, $P<0.05$). Conclusion The Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* are predominant in children with tuberculosis in Chongqing and are not correlated with their age, sex, residence, BCG vaccination and tuberculous meningitis. Isoniazid-resistance and streptomycin-resistance are easier to occur in children infected with Beijing genotype strains.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; drug-resistance; genotype; Beijing genotype

Supported by the Foundation of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2008-2-177). Corresponding author: Zhu Chaomin, Tel: 86-23-63631609, E-mail: zhuchaomin@yahoo.com.cn

1995年Van-Soolingen等[1]发现并报道了与耐多药"W"株同源的北京基因型结核分枝杆菌,研究表明其具有较强的获得耐药性的能力,并且推测卡介苗(BCG)不能对该基因型结核分枝杆菌的感染起到预防作用[2]。我国于2000年开展的全国第4次结核病流行病学抽样调查中发现,北京基因型结核分枝杆菌以50.75%的比例在我国流行[3]。北京基因型菌株具有的特异分子标志RD105缺失区,Chen等[4]基于此而建立的DTM-PCR,也被证实为是简单实用的快速鉴定北京基因型菌株的方法。本研究使用该文献的DTM-PCR基因分型方法对重庆医科大学附属儿童医院临床结核病患者分离的结核分枝杆菌进行分析,了

【基金项目】 重庆市卫生局科研基金(2008-2-177)
【通信作者】 朱朝敏,电话:(023)63631609,E-mail:zhuchaomin@yahoo.com.cn

解北京基因型结核分枝杆菌在重庆市儿童结核患者中的流行情况，并分析北京基因型菌株与相关因素以及耐药表型之间的关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象和实验菌株

2003年7月至2008年6月，重庆医科大学附属儿童医院感染科共收集保存了164株分枝杆菌，其中每一株分枝杆菌对应1例患儿。按全国结核病细菌学检验标准化规程进行分枝杆菌复苏、分离培养、菌种鉴定。同时收集确诊为结核分枝杆菌感染患儿的性别、年龄、居住地以及是否接种卡介苗、是否为结核性脑膜炎患儿等临床资料。H37Rv标准菌株由重庆市结核病防治所提供。

1.2 主要仪器和试剂

ChemiDoc XRS + 凝胶成像系统(Bio-Rad公司)，MyCycler个人梯度PCR(北方伟业公司)，Baygene BG-subMIDI多用水平电泳仪(BAYGEE公司)，*Taq* DNA聚合酶、GoldView™ DNA染料、细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)均由北京天根生化科技有限公司提供，菌种鉴定培养基和药物敏感性测定培养基由重庆市结核病防治所提供。

1.3 DNA提取

使用北京天根生化科技有限公司提供的细菌基因组DNA提取试剂盒，按步骤提取结核分枝杆菌DNA。

1.4 菌株鉴定和药敏实验

结核分枝杆菌菌株鉴定按照《全国结核病诊断细菌学检验规程》规定，采用对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基作为菌种鉴定培养基，进行分枝杆菌菌种的初步鉴定。采用绝对浓度法对链霉素(streptomytin，SM)、异烟肼(isoniazide，INH)、吡嗪酰胺(aldinamide，PZA)、利福平(rifampicin，RFP)和乙胺丁醇(ethambutol，EMB)5种一线药物进行药敏实验，结果判定标准参照《肺结核诊断与治疗指南》，其中耐多药是指同时耐INH和RFP 2种抗结核药物，无论是否耐其他药物[5]。

1.5 引物设计和结核分枝杆菌北京基因型分型

按照文献[4]创立的以RD105为分子标志的DTM-PCR，对结核分枝杆菌进行北京基因型菌株的鉴定：结核分枝杆菌如果存在基因RD105的缺失则为北京基因型菌株。PCR引物由北京天根生化科技有限公司合成。采用10 μl PCR反应体系：在10 μl PCR反应体系中包括引物各0.5 μl，2 × *Taq* PCR Master-Mix 5.0 μl，DNA模板1.0 μl左右。反应条件是：预变性94 ℃ 5 min，94 ℃变性30 s，60 ℃退火复性30 s，72 ℃引物延伸2 min，循环30次后，最后1个循环72 ℃再延伸7 min。用2%的琼脂糖凝胶电泳分离PCR扩增产物，100 bp DNA ladder作为分子量标准，如果为北京基因型，可见766 bp的条带，如果为非北京基因型，则为1 466 bp大小。

1.6 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行 χ^2 检验和Fisher确切概率法检验。

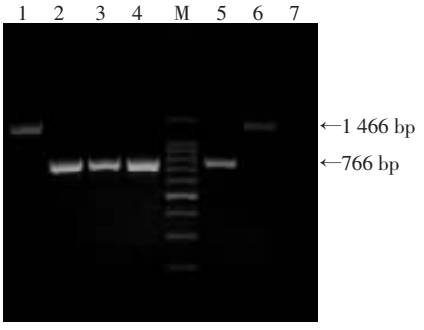
2 结果

2.1 分枝杆菌菌种初步鉴定

164株分枝杆菌复苏有5例失败，剩下159株分枝杆菌，其中结核分枝杆菌占89.9%(143/159)，牛分枝杆菌占3.8%(6/159)，10株属非结核分枝杆菌，占6.3%(10/159)。

2.2 北京基因型与非北京基因型菌株各因素的比较

在143株结核分枝杆菌中，91株为北京基因型，占63.6%，剩下52株为非北京基因型，占36.4%，见图1。北京基因型与非北京基因型患儿在不同年龄、性别、居住地、是否接种卡介苗、是否为结核性脑膜炎之间无统计学差异($P > 0.05$，表1)。



1：非北京基因型菌株；2～5：北京基因型菌株；M：标准；6：标准株；7：阴性对照

图1 不同结核分枝杆菌DTM-PCR结果

表1 北京基因型与非北京基因型菌株各因素的比较(例)

因素	*n*	北京基因型	非北京基因型
年龄			
0～3岁	41	29	12
4岁以上	102	62	40
性别			
男/女	80/63	49/42	31/21
居住地			
城镇	79	47	32
农村	64	44	20
卡介苗接种情况			
已接种	68	43	25
未接种	75	48	27
是否为结核性脑膜炎患儿			
是	65	39	26
否	78	52	26

2.3 北京基因型菌株与耐药表型的关系

143株结核分枝杆菌对5个一线药物全部均敏感的有113株(79.0%)，耐药株30株(21.0%)。其中单耐药菌株17株(11.9%)，耐2种药物菌株4株(2.8%)，耐3种药物菌株6株(4.2%)，耐4种药物菌株3株(2.1%)，未有5种一线药物均耐药的菌株，其中耐多药菌株10株(7.0%)。对SM、INH、RFP、PZA、EMB的耐药菌株数目分别是17(11.8%)、16(11.2%)、13(9.1%)、4(2.8%)、4(2.8%)。北京基因型菌株耐药率为23.1%(21/91)，非北京基因型菌株则为17.3%(9/52)，二者耐药率差异无统计学意义($P > 0.05$)。同时在北京与非北京基因型菌株中，耐利福平的比例分别是10.9%(10/91)和5.8%(3/52)，耐多药菌株的比例则是8.8%(8/91)和3.8%(2/52)，2种基因型的耐利福平和耐多药率也无明显差异($P > 0.05$)。而北京基因型耐SM和耐INH菌株的比例分别是16.5%(15/91)和15.4%(14/91)，明显比非北京基因型高[均是3.8%(2/52)，$P < 0.05$]。因为本研究样本中耐PZA和耐EMB菌株太少，所以未单独对这2种耐药株进行检验。

3 讨论

结核病是一种对公众健康造成了严重危害的传染性疾病,其中北京基因型结核分枝杆菌达到全球分离结核菌株的13%[6],全世界有1/3的结核病由北京基因型结核分枝杆菌引起。在我们的研究中发现,北京基因型占所有结核菌株的比例达到63.6%,明显高于南非capetown的儿童结核33.2%的比例[7],这说明它是重庆地区儿童结核患者中的优势菌群。因为儿童结核病反映了结核病近期感染的情况[8],这也表明北京基因型菌株在重庆地区的近期传播中占据主导地位。一些学者认为北京基因型菌株的产生可能是由于长期的BCG接种选择性压力造成的,并且在东亚等地传播[2],但我们发现它与BCG是否接种并无显著性的关系。有研究证明随着时间推移BCG的保护效益将减少[9],而我们的研究对象是儿童群体,接种BCG的时间较短,保护性效果高,相对于以成人群体为研究对象的实验[2],这更有力的证明了BCG对北京基因型的传播并无选择性压力。人类免疫系统的发育随着年龄的增长而逐渐达到成人水平,而婴幼儿处在生理性免疫低下的状态,例如对防止结核致病有重要作用的CD4细胞,与CD8细胞的比例一般在2~3岁才达到成人水平。我们比较了4岁以上与0~3岁年龄组的患儿,发现在感染北京基因型菌株的比例上2组无明显差异,这表明北京基因型菌株并不容易在相对低免疫力的婴幼儿群体中传播。Tsenova等[10]发现,北京基因型结核杆菌更易从其感染兔的肺部播散至脑脊液中,但我们的研究发现在结核性脑膜炎患儿中,两者无显著性差异,这表明北京基因型并不是结核性脑膜炎的高危因素。我们还发现北京基因型菌株在城镇与农村患儿之间的分布也无统计学差异,这与张立兴等[11]研究的结果一致。这可能是因为现在进城务工人员增多,城乡人员流动频繁,导致北京基因型菌株传播的范围更加广泛,并不局限在城镇或农村流行。

由于耐多药北京基因型菌株多次引起暴发性流行,使得北京基因型菌株与耐药之间的关系成为了研究的热点,但研究结果不尽相同。例如越南胡志明市、美国纽约等地区的北京基因型菌株耐药率高于非北京基因型菌株[12]。而印度尼西亚、阿塞拜疆、哥伦比亚等地区的北京基因型菌株与非北京基因型菌株耐药率无显著差异[13]。本研究发现在耐药菌株中,北京基因型菌株的比例与非北京基因型菌株并无差异,同时,我们在耐多药菌株以及RFP耐药株中未显示与北京基因型菌株之间的联系,这一研究结果与新加坡,俄罗斯的研究不同[14,15],但与李卫民等[16]的研究结果相类似。我们发现在北京基因型菌株中,耐INH和SM的比例明显高于非北京基因型,其中耐INH与Jou等[17]研究的结果类似,而耐SM与王胜芬等[18]研究的结果不同。北京基因型具有INH和SM高耐药率的机制并不清楚,有研究报道其具有INH高耐药率原因可能与katG315基因的变异有关,北京基因型耐异烟肼(INH)菌株中katG基因发生的S315T(Arg→Leu)突变频率十分高[19]。而耐SM北京基因型菌株目前尚少类似报道。在耐药性上北京基因型菌株显示出不均一性,可能与该基因型是由相似表型的菌株形成的集合体有关,而不同型别之间对药物造成的选择性的压力并不一样,例如在南非的研究发现北京基因型亚群220已被证实为耐药菌株[7],因此不同的亚型在各地分别占主要的优势,这也许是造成国内外研究结果多样化的原因之一。

由于本研究抽取的样本量相对较少,故只能反映重庆地区儿童结核病患者的大体情况。因此与一些研究结果的不同,可能也与特定人群、样本量及地区差异有关。同时因为条件有限,本实验未进行二线抗痨药物的耐药测试,因此未研究广泛耐药结核病(extensively drug-resistant tuberculosis,XDR-TB)在儿童群体中的发病趋势以及与北京基因型菌株的关系。在以后的研究里,我们将扩大样本量来获得更准确的基因分型的分布状况,进行更全面的耐药检测了解XDR-TB的发病情况,对不同亚型与耐药因素的关系也会进行更深入的探讨,这为探讨北京基因型菌株在儿童中的传播规律,阻止其在我国儿童中的流行具有重要意义。

参考文献:

[1] Van-Soolingen D, Qian L, de-Haas P E, *et al*. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(12):3234-3238.

[2] Kremer K, Van-der-Weft M J, Au B K, *et al*. Typical and atypical strains of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype have different levels of association with BCG vaccination and drug resistance[J]. Emerg Infect Dis, 2005, Submitted for publication.

[3] 李卫民,端木宏谨,王黎霞,等.2000年中国结核病流行病学抽样调查菌株分子流行病学特征[J].中华医学杂志,2003,83(14):1210-1213.

[4] Chen J, Tsolaki A G, Shen X, *et al*. Deletion-targeted multiplex PCR (DTM-PCR) for identification of Beijing/W genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Tuberculosis (Edinb), 2007, 87(5):446-449.

[5] 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(2):70-74.

[6] Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity:mining the fourth international spoligotyping database(SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology[J]. BMC Microbiol, 2006, 6:23.

[7] Marais B J, Victor T C, Hesseling A C, *et al*. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drug-resistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10):3539-3543.

[8] Hoskyns W. Paediatric tuberculosis[J]. Postgrad Med J, 2003, 79(931):272-278.
[9] Fourth report to the medical research council by its tuberculosis vaccines clinical trials committee. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life[J]. Bull World Health Organ, 1972, 46(3):371-385.
[10] Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, *et al*. Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli[J]. J Infect Dis, 2005, 192(1):98-106.
[11] 张立兴, 丁北川, 屠德华, 等. 北京结核菌株分子流行病学的研究[J]. 中国防痨杂志, 2001, 23(3):141-147.
[12] Anh D D, Borgdorff M W, Van L N, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam[J]. Emerg Infeet Dis, 2000, 6(3):302-305.
[13] van-Crevel R, Nelwan R H, de-Lenne W, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(5):880-883.
[14] Sun Y J, Lee A S, Wong S Y, *et al*. Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2007, 11(4):436-442.
[15] Toungoussova O S, Sandven P, Mariandyshev A O, *et al*. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6):1930-1937.
[16] 李卫民, 柴利泉, 李丽, 等. 天津地区临床分离株结核分枝杆菌分子流行病学研究[J]. 结核病与胸部肿瘤, 2007, (1):18-25.
[17] Jou R, Chiang C Y, Huang W L. Distribution of the Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1):95-100.
[18] 王胜芬, 赵雁林, 黄海荣, 等. 结核分枝杆菌北京基因型菌株与耐药表型的关系[J]. 中国医学科学院学报, 2009, 31(4):427-431.
[19] Tracevska T, Jansone I, Baumanis V, *et al*. Prevalence of Beijing genotype in Latvian multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(11):1097-1103.

(收稿 2010-07-02 修回 2010-08-26)
(编辑 吴培红)

(上接2544页)

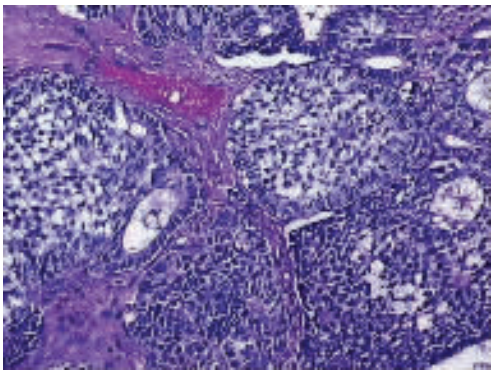


图1 卵巢两性母细胞瘤的病理观察(HE ×100)

2 讨论

卵巢两性母细胞瘤由 Meyer 1930 年首次报道,并于 1973 年列入世界卫生组织制定国际卵巢肿瘤组织分类的性索-间质肿瘤。依据 WHO 的意见,两性母细胞瘤是指肿瘤内含有分化好的典型卡-埃小体的颗粒细胞瘤和卵泡膜瘤成分,以及分化好的支持细胞肿瘤成分[2]。本例病理符合该诊断标准。这种肿瘤至今国内外报道仅数十例,其来源不明,可能来自具有向两性分化潜能的性腺间叶或性索组织[3]。

该病好发于生育年龄女性[4]。临床症状取决于肿瘤细胞的比例和激素分泌情况。可出现雌激素过高症状(如月经过多、子宫内膜增生症等),或出现男性化症状(如多毛、阴蒂肥大、闭经、声音低沉等),或同时出现男、女两性化症状。该肿瘤多为单侧,呈卵圆形,实性,直径 <6 cm。

本例患者自月经初潮开始即出现月经稀发症状,伴有喉结突出、声音低沉、阴蒂肥大等男性化症状。于生育年龄阶段表现为不孕及闭经,多次人工周期治疗均未能使月经复潮,而宫腔镜检查证实无宫腔黏连等器质性病变。将肿块切除后数天血清睾酮即降至正常水平,术后 1 个月患者月经即恢复正常,而患者前期治疗中曾反复多次人工周期治疗仍无月经来潮,但患者并无子宫性闭经。提示本例患者闭经与雌孕激素水平无关,而血清睾酮水平异常升高是导致患者闭经与不孕的原因。

尽管本瘤多数在形态上呈良性表现,但目前仍视为低度恶性肿瘤[5],应密切随访。对于该病的治疗,多数学者主张切除患侧附件或兼行子宫切除术即可治愈。而对于年轻患者为保留生育功能,手术范围可局限于切除患侧附件。由于病例较少,且随访时间不长,最后定论需进一步积累资料。该例患者术中快速病检报告为高分化型卵巢支持间质细胞瘤,倾向良性病变,因此征求患者家属意见后仅行肿瘤剥除。术后及妊娠期间监测 B 超未见明显异常,但仍需密切随访观察。

参考文献:

[1] McGluggage W G, Sloan J M, Murnaghan M, *et al*. Gynandroblastoma of the ovary with juvenile granulosa cell component and heterologous intestinal type glands[J]. Histopathology, 1996, 29(3):253-257.
[2] Tavassoli F A, Devilee P. 世界卫生组织肿瘤分类及诊断标准系列·乳腺及女性生殖器官肿瘤病理学和遗传学[M]. 程虹, 戴林, 郭双平, 等, 译. 北京:人民卫生出版社, 2006:180-198.
[3] 张建民. 中华临床病理学丛书. 卵巢病理学[M]. 南昌:江西科学技术出版社, 2006:398-401.
[4] Lee K R, Tavassoli F A, Pratt J, *et al*. Surface epithelial-stromal tumors[M]//Tavassoli F A, Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyonl:IARC Press, 2002:159.
[5] Russell P, Robboy S J, Anderson M C. Sex cord-stromal andsteroid cell tumors of the ovaries[M]//Robboy S J, Anderson M C, Russell P. Pathology of the female reproductive tract. London: Churchill Livingstone, 2002:633-634.

(收稿 2010-08-02 修回 2010-09-03)
(编辑 王 红)