·论 著·

药物敏感性试验与全基因组测序检测抗结核药物耐药性的比较研究

喻秋菊,侯 杰,林钰灵,罗 佳,谢 轶,马 莹△
四川大学华西医院实验医学科,四川成都 610041

摘 要:目的 通过药物敏感性试验(DST)和全基因组测序(WGS)检测结核分枝杆菌(MTB)的耐药情况,比较二者一致性,探讨全基因测序用于 MTB 耐药性检测的特点。**方法** 选取 2018—2020 年留存于四川大学华西医院共 71 例 MTB 临床分离株,采用 DST(氧化还原指示剂法)和 WGS 两种方法对菌株进行异烟肼(INH)、利福平(RIF)、链霉素(SM)、乙胺丁醇(EMB)、莫西沙星(MFX)、氧氟沙星(OFX)、左氧氟沙星(LFX)、卡那霉素(KAN)、阿米卡星(AMK)、卷曲霉素(CPM)、乙硫异烟胺(ETH)、利福布汀(RFB)、对氨基水杨酸(PAS)和氯法齐明(CLO)共 14 种药物的耐药性检测,并对结果进行 Kappa 检验分析。**结果** 两种方法对 RIF、RFB、SM、MFX、OFX 和 LFX 6 种药物耐药性检测的符合率均超过 90.00%,Kappa 值均大于 0.80,一致性较好;INH 和 EMB 耐药性检测的符合率分别为 84.51%,81.69%,Kappa 值分别为 0.68 和 0.54,一致性一般;AMK 和 KAN 两种方法检测的耐药株未超过 2 株,耐药率小于 3.00%;CPM、ETH、PAS、CLO 耐药性检测的符合率范围为 61.97%~91.55%,Kappa 值均小于 0.40,一致性较差。**结论** WGS 检测不同抗结核药物耐药性的能力存在差异,其检测 RIF、RFB、SM、MFX、OFX 和 LFX 6 种药物耐药性效果较佳,而检测其他抗结核药物耐药性与 DST 相比较仍存在一定差异,需要进一步明确相关药物的详细耐药机制,并对 WGS 用于耐药性分析的标准化进行探索。

关键词:结核分枝杆菌; 药物敏感性试验; 全基因组测序; 一致性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.03.022 **中图法分类号:**R181.3
文章编号:1673-4130(2024)03-0378-07 **文献标志码:**A

Comparative study of drug susceptibility testing and whole genome test testing anti-tuberculosis drug resistance

YU Qiuju,*HOU Jie*,*LIN Yuling*,*LUO Jia*,*XIE Yi*,*MA Ying*△
Department of Laboratory Medicine,*West China Hospital*,*Sichuan University*,
Chengdu,*Sichuan* 610041,*China*

Abstract:Objective To compare the categorical agreement between drug susceptibility testing(DST) and whole genome sequencing(WGS) for the detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis(MTB), and to explore the characteristics of WGS for MTB drug resistance detection. **Methods** A total of 71 MTB clinical isolates retained in West China Hospital of Sichuan University from 2018 to 2020 were included in this study. The MTB strains were tested for resistance to 14 anti-tuberculosis drugs, including Isoniazid(INH), Rifampicin(RIF), Rifabutin(RFB), Ethambutol(EMB), Streptomycin(SM), Moxifloxacin(MFX), Ofloxacin (OFX), Levofloxacin(LFX), Amikacin(AMK), Kanamycin(KAN), Capreomycin(CPM), Para-aminosalicylic acid(PAS), Ethionamide(ETH) and Clofazimine(CLO), using both DST(colorimetric redox indicator method) and WGS methods. Kappa test was performed to analyze the results of drug resistance detection for both methods. **Results** Based on DST and WGS methods to detect anti-tuberculosis drug resistance in seventy-one MTB clinical isolates, the results showed that the agreement rate of RIF, RFB, SM, MFX, OFX and LFX exceeded 90.00%, and the kappa values were all greater than 0.80, with near perfect agreement; The agreement rates of INH and EMB were 84.51% and 81.69%, and Kappa values were 0.68 and 0.54, respectively, with fair agreement. No more than two drug resistant MTB strains of AMK and KAN were detected by both methods, and the resistance rate was less than 3.00%. The agreement rates of CPM, ETH, PAS, and CLO ranged from 61.97% to 91.55%, and the Kappa values were less than 0.40, with slight or fair agreement. **Conclusion** There are differences in the ability of WGS to detect resistance to various anti-tuberculosis drugs,

作者简介:喻秋菊,女,技师,主要从事病原微生物诊断及感染免疫学研究。 △ 通信作者,E-mail:majiying72@hotmail.com。

and it is more effective in detecting resistance to six anti-tuberculosis drugs,including RIF,RFB,SM,MFX,OFX and LFX,while there are still certain differences in detecting resistance to other anti-tuberculosis drugs compared with DST. It is necessary to further clarify the detailed resistance mechanisms of relevant anti-tuberculosis drugs and to explore the standardization of WGS for drug resistance detection.

Key words: Mycobacterium tuberculosis;　drug susceptibility testing;　whole genome sequencing;　agreement

结核病是由结核分枝杆菌(MTB)引起的一类慢性传染病。据世界卫生组织(WHO) 2022 年全球结核病报告显示,结核病全球疾病负担高,MTB 耐药常见,中国位居耐药结核病高负担国家前列[1]。抗结核药物敏感性检测对于制订患者的个体化治疗方案、地区耐药监测等至关重要。传统的表型药物敏感试验(DST)耗时长,往往无法常规开展;快速靶向分子检测方法能明显缩短时间,目前被广泛运用于临床,但其检测耐药突变位点有限。全基因组测序(WGS)克服了传统的表型 DST 及快速靶向分子检测的局限性,具有快速、高通量、准确度高、能够检测所有已知的耐药相关突变位点等优点,且伴随测序成本的降低,其在临床 MTB 耐药检测中的应用日益广泛。本研究通过 DST 和 WGS,检测四川大学华西医院共 71 例 MTB 临床分离株对 14 种药物耐药情况,分析耐药基因突变类型和特点,并探讨两种方法的一致性,以便能够为结核分枝杆菌感染检测和治疗提供科学依据,对结核病的防控和治疗具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　2018—2020 年留存于四川大学华西医院实验医学科共 71 株 MTB 临床分离株。所有菌株分离自临床标本 MGIT 960 液体培养阳性培养物,且分枝杆菌萋-尼抗酸染色镜检阳性,结核分枝杆菌特异性抗原 MPT64 检测阳性(排除非结核分枝杆菌)。

1.2　仪器与试剂　主要仪器:BACTECTM MGIT 960(美国 BD 公司)。主要试剂:罗氏培养管(珠海贝索生物技术有限公司);结核分枝杆菌抗原 MPT64 检测试剂盒(标准诊断韩国股份有限公司);结核分枝杆菌药敏试剂盒(中国郑州安图生物工程股份有限公司)。

1.3　研究方法

1.3.1　菌株复苏培养　将含有 MTB 临床分离株菌液的冻存管放入 37 ℃恒温培养箱中复苏,使用无菌滴管混匀菌液,吸取 0.3 mL 菌液接种至罗氏培养基上,37 ℃恒温培养箱中培养 2～3 周,获得纯化菌落。

1.3.2　DST　本研究菌株使用氧化还原指示剂(CRI)法严格按照安图生物技术公司结核分枝杆菌药敏试剂盒说明书操作,CRI 是 WHO 推荐的检测结核分枝杆菌药敏的方法[2],主要通过氧化还原指示剂颜色变化显示结核分枝杆菌是否生长。操作如下。制备麦氏标准 1 号管浊度的菌悬液,吸取 1 麦氏菌悬液 0.2 mL,添加到 1 瓶培养液中,充分混匀;用无菌吸管吸取 0.5 mL 添加有菌悬液的培养液至药敏板各个板孔中,盖上盖子,将药敏板放入透明自封袋中密封,35～37 ℃培养;培养 6 d 后,每日观察质控孔,质控孔出现白色颗粒沉淀后,每孔分别添加显色剂 A 12 μL、显色剂 B 25 μL,35～37 ℃培养,24～48 h 后判读结果。14 种抗结核药物分别是异烟肼(INH)、利福平(RIF)、链霉素(SM)、乙胺丁醇(EMB)、莫西沙星(MFX)、氧氟沙星(OFX)、左氧氟沙星(LFX)、阿米卡星(AMK)、卡那霉素(KAN)、卷曲霉素(CPM)、利福布汀(RFB)、乙硫异烟胺(ETH)、对氨基水杨酸(PAS)、氯法齐明(CLO)。

1.3.3　WGS　用一次性无菌接种环挑取上述复苏培养后的纯化菌落黄豆粒大小至 TE 溶液中,金属浴 80 ℃灭活 30 min。灭活后的样品干冰邮寄至上海晶诺生物科技有限公司,在 Illumina 平台上构建文库进行测序,测序完成后返回测序原始数据。

1.3.4　WGS 数据质控　获得的测序原始数据用 Trimmomatic(v0.39)软件去除原始数据中的接头序列并过滤掉碱基质量＜20 的低质量 reads[3];用 FastQC(v0.20.0)对上述 Trimmomatic,处理过的数据进行质控,得到 clean data 用于后续分析[4]。

1.3.5　WGS 耐药预测　用 TBProfiler(https://github.com/jodyphelan/tbdb)对 14 种抗结核药物进行耐药预测[5-6]。为了最大程度地覆盖可能的耐药基因,除了 TBProfiler 所参考的 tbdb 结核分枝杆菌耐药数据库外,分析讨论中结合相关研究补充了其他药物相关耐药基因:INH(nat、ndh、inia、inib、inic、Rv0340、efpA、furA、fadE24、Rv1592c、Rv1772 和 fabD)、CPM(Rv0194、Rv1258c)、PAS(papA1、sigB、Rv1258c、mmpL11、Rv0044c、Rv0954 和 nuoL),但因为这些基因与 MTB 药敏表型耐药尚存在争议,有待进一步研究,因此上述基因突变暂不作为判断药物敏感性的标准[7-10]。用 Snippy(v4.6.0)以 MTB 标准菌株 H37Rv(GenBank ID:NC_000962.3)为参考基因组进行比对,提取 SNP 序列[11];用 Blast 工具将 SNP 序列同标准菌株比对,检测耐药相关基因序列内的突变位点。于 NCBI 网站比对突变位点所在的读码框,

明确突变类型,以是否发生耐药相关突变作为判断药物敏感性的标准。除非特别说明,本研究所用的生物信息学软件一般都采用默认参数设置。

1.4　统计学处理　采用 R(4.2.3 版本)软件对数据进行统计学分析。通过 Kappa 检验分析两种方法一致性(Kappa≥0.75 二者一致性较好;0.75>Kappa≥0.40 二者一致性一般;Kappa<0.40 二者一致性较差)。

2　结　　果

2.1　MTB 临床分离株表型 DST 和 WGS 耐药预测结果　两种方法分别检测 71 株 MTB 临床分离株对 14 种药物的耐药情况,结果见表 1。

2.2　两种耐药检测方式一致性对比　对 DST 和 WGS 两种方法进行一致性分析 Kappa 检验,结果显示,一线抗结核药物 RIF、RFB 和 SM,二线抗结核药物氟喹诺酮类 MFX、OFX 和 LFX,以及氨基糖苷类药物 AMK,这 7 种药物耐药一致性检测最好,符合率均超过 90.00%,Kappa 值均>0.80;一线抗结核药物 INH 和 EMB 符合率均超过 80%,但 Kappa 值分别为 0.68 和 0.54,一致性一般。KAN、ETH、CPM、CLO 和 PAS 这 5 种药物一致性均较差。见表 2。

表 1　71 株 MTB 表型 DST 和 WGS 耐药情况

药物	DST(株)		DST 耐药率(%)	WGS(株)		WGS 耐药率(%)
	S	R		S	R	
INH	39	32	45.07	46	25	35.21
RIF	51	20	28.17	49	22	30.99
RFB	58	13	18.31	55	16	22.54
EMB	53	18	25.35	50	21	29.58
SM	55	16	22.54	53	18	25.35
MFX	54	17	23.94	53	18	25.35
OFX	55	16	22.54	53	18	25.35
LFX	56	15	21.13	53	18	25.35
CPM	44	27	38.03	68	3	4.23
AMK	70	1	1.41	70	1	1.41
KAN	69	2	2.82	70	1	1.41
PAS	65	6	8.45	69	2	2.82
ETH	54	17	23.94	65	6	8.45
CLO	62	9	12.68	71	0	0.00

注:S 为敏感;R 为耐药。

2.3　DST 表型耐药和同时 WGS 发生基因突变的临床分离株有关基因突变类型分析　将 DST 检测得到的表型耐药株和同时经 WGS 检测发生基因突变的菌株数据相结合,结果显示,INH 耐药株最常见的突变类型为 katG S315T,有 1 株发生 katG T394A + inhA S94A + fabG1 -15C>T 联合突变。RIF 和 RFB 最常见的突变类型均为 rpoB S450L,其次为 rpoB L452P。EMB 耐药株主要与 embB 基因不同位点发生突变有关,主要为 306 和 406。SM 耐药株主要突变类型为 rpsL K43R 和 rrs 514A>C。喹诺酮类药物 MFX、OFX 和 LFX 耐药株主要发生 gryA D94G、D94N 和 A90V 基因突变。氨基糖苷类药物 AMK、KAN 和 CPM 突变类型较单一,为 rrs 1401A>G 突变。ETH 耐药株有 2 株,分别是 inhA 联合 fabG1 基因突变和 ethA 基因突变。PAS 耐药株仅 1 株发生 folC 基因突变;CLO 未检出相关耐药基因。见表 3。表 3 中仅列出至少有 2 株的药物突变类型数量,因为氨基糖苷类 AMK、KAN 和 CPM,CLO、ETH、PAS 耐药株少,突变类型单一且无主要突变类型故未列出。

表 2　DST 和 WGS 检测一致性分析

DST		WGS(株)		符合率(%)	Kappa 值
		R	S		
INH	R	23	9	84.51	0.68
	S	2	37		
RIF	R	20	0	97.18	0.93
	S	2	49		
RFB	R	13	0	95.77	0.87
	S	3	55		
EMB	R	13	5	81.69	0.54
	S	8	45		
SM	R	15	1	94.37	0.85
	S	3	52		
MFX	R	17	0	98.59	0.96
	S	1	53		
OFX	R	16	0	97.18	0.92
	S	2	53		
LFX	R	15	0	95.78	0.88
	S	3	53		
CPM	R	1	26	61.97	0.02
	S	1	43		
AMK	R	1	0	100.00	1.00
	S	0	70		
KAN	R	1	1	98.59	0.66
	S	0	69		
PAS	R	1	5	91.55	0.22
	S	1	64		
ETH	R	2	15	73.24	0.06
	S	4	50		
CLO	R	0	9	87.32	—
	S	0	62		

注:S 为敏感;R 为耐药;—表示无数据。

表 3　MTB 表型耐药株基因突变类型

药物	DST 耐药(株)	基因突变类型	构成比[n(%)]
INH	23	katG S315T	22(95.65)
		inhA S94A+ katG T394A+ fabG1 -15C>T	1(4.35)
RIF	20	rpoB S450L	10(50.00)
		rpoB L452P	3(15.00)
		其他[a]	7(35.00)
RFB	13	rpoB S450L	8(61.54)
		rpoB L452P	3(23.08)
		rpoB H445D	1(7.69)
		rpoB S450L+rpoC F452S	1(7.69)
EMB	13	embB M306I	4(30.77)
		embB G406A	3(23.08)
		embB M306V	2(15.38)
		embB M306I	2(15.38)
		embB G406D	1(7.69)
		embB A357S	1(7.69)
SM	15	rpsL K43R	10(66.67)
		rrs 514A>C	3(20.00)
		rrs 514A>C+gid 第 326 位碱基 G 缺失	1(6.67)
		rpsL K43R+gid 第 351 和 352 位之间插入碱基 G	1(6.67)
MFX	17	gyrA D94G	5(29.41)
		gyrA D94N	5(29.41)
		gyrA A90V	2(11.76)
		其他[b]	5(29.41)
OFX	16	gyrA D94G	5(31.25)
		gyrA D94N	5(31.25)
		gyrA A90V	2(12.50)
		其他[c]	4(25.00)
LFX	15	gyrA D94G	5(33.33)
		gyrA D94N	5(33.33)
		gyrA A90V	2(13.33)
		其他[d]	3(20.00)

注：其他[a] 包括 rpoB H445L 1 株，rpoB H445D 1 株，rpoB(D435G+L430P)1 株，rpoB(D435Y+N437H)1 株，rpoB(L430P+F424L) 1 株，rpoB(D435A+L430P)1 株，rpoC F452S+rpoB S450L 1 株；其他[b] 包括 gyrB T500I 1 株，gyrA S91P 1 株，gyrA D94A 1 株，gyrB T500I+gyrA D94G 1 株，gyrB A504V+gyrA D94G 1 株；其他[c] 包括 gyrA S91P 1 株，gyrA D94A 1 株，gyrB T500I+gyrA D94G 1 株，gyrB A504V+gyrA D94G 1 株；其他[d] 包括 gyrA S91P 1 株，gyrB T500I+gyrA D94G 1 株，gyrB A504V+gyrA D94G 1 株。

3　讨　论

结核分枝杆菌表型 DST 方法可检测多种抗结核药物的耐药性且不受耐药机制限制，如比例法，MIC 检测等，但表型 DST 方法也有较多局限性，如 MTB 培养周期长，接近临界值时难以判读等[12]。随着 MTB 耐药分子机制的阐明，实时荧光定量 PCR、探针熔解曲线法、基因芯片技术等靶向分子检测方法通过基因扩增可以快速而敏感地从分离株或预处理的临床标本检测 MTB 相关耐药基因型或常见耐药决定区域，但目前商业化试剂并未涵盖所有的耐药突变位点，可能出现假阴性[12-15]。WGS 可以完整地描述 MTB 耐药株的基因组特征，广泛涵盖多种抗结核药物的基因突变位点，在 MTB 耐药性检测、谱系或亚种鉴定(菌株分型)、微进化及结核病流行病学等方面的研究越来越广泛[16]。本研究通过表型 DST 和 WGS 同时检测 MTB 临床分离株 14 种抗结核药物的耐药性，评估 WGS 用于 MTB 耐药性检测与表型 DST 的一致性，分析 WGS 对不同抗结核药物耐药性检测的

优缺点。

RIF、RFB 和利福喷丁（RFT）均为一线抗结核药物，其作用靶标 DNA 依赖性 RNA 聚合酶（RNAP）β 亚单位编码基因 rpoB 突变可能导致 MTB 对其耐药，三者具有 70%～90% 的交叉耐药率[17]。本研究中 RIF、RFB 两种耐药性检测方法符合率＞95%，一致性良好，与已有研究结果类似[18-19]。本研究利福霉素类主要突变类型为 rpoB S450L 和 rpoB L452P。

INH、ETH 属于结构类似物，经各自的酶激活后，作用共同靶点 inhA，若 MTB 有 inhA 基因突变，则二者可能存在交叉耐药[20-21]。本研究结果显示，INH 符合率超过 80%，一致性一般，ETH 一致性较差，这可能与其复杂的分子作用和耐药机制有关。INH 涉及 katG、inhA、ahpC、kasA、ndh、iniABC、fadE、furA、Rv1592c 和 Rv1772 等多个基因的突变及表达改变，ETH 涉及 ethA、inhA、ethR、fabG1 等基因[21-23]。本研究中 DST 和 WGS 检测 INH 耐药性结果不一致菌株有 11 株（15.49%，11/71），其中有 9 例 INH 表型耐药株未发现 INH 常见基因（katG、inhA、ahpC、fabG1）。而进一步分析 INH（nat、ndh、inia、inib、inic、Rv0340、efpA、furA、fadE24、Rv1592c、Rv1772 和 fabD）相关耐药基因[7]，结果显示，共 71 例 MTB 临床分离株中，只有在上述 9 株表型耐药株中有 1 株存在 ndh P315L，1 株存在 nat G207R，1 株存在 inib S265G，1 株在 inib 基因碱基 657 位和 658 位之间插入一段 GTTGGCGCTGGT 共 12 bp 长的序列，提示这 4 种突变可能与 INH 耐药相关。

乙胺丁醇耐药机制比较复杂，与 embCAB 操纵子、embR、ubiA 等基因突变有关，且以 embB 突变为主[24-25]。对于 EMB，EMB 耐药一致性一般主要也是因为 DST 和 WGS 结果不一致菌株较多，共有 13 株（18.31%，13/71），其中有 8 株表型敏感但检出 6 种突变位点，分别是 embB M306I、M306V、G406A、G497R、A659T＋A388G＋L359I＋H312R＋N399 位点联合和 embA -16C＞G。有研究报道，embB M306I、M306V、G406A、Q497R 在 EMB 表型耐药和敏感中均有存在[26-27]。有研究表明，embB M306I 存在突变的分离株的 MIC 接近或轻微大于 EMB 耐药的界定浓度，即 embB M306I 有时还并不足以判断药物表型耐药[28]。因此也推测另外 5 种位点突变的原因可能与 embB M306I 类似。另外，在 5 例表型耐药株中有 1 例检出 embA G1085V 突变，可能是一种新的 embA 耐药相关突变位点。

氟喹诺酮类药物 MFX、OFX、LFX 是治疗耐多药结核病的重要药物，靶点是Ⅱ型 DNA 拓扑异构酶，其耐药机制主要涉及 gyrA、gyrB 基因突变[29]。本研究中 MFX、OFX、LFX 耐药率在 20.00%～25.00%，两种耐药性检测方法符合率＞95.00%，一致性良好，BERNARD 等[30]研究也显示 gyrA、gyrB 联合测序显示了表型 DST 方法检测氟喹诺酮类的局限性。氟喹诺酮类药物主要突变类型为 gyrA D94G、gyrA D94N、gyrA A90V，氨基酸最常见替代位置为 D94，与先前研究一致[30-31]。

本研究中氨基糖苷类药物中耐药率明显存在差别，SM 耐药率＞20.00%，而 KAN、AMK 耐药率不足 3.00%，先前的研究也同样发现这种差异[32]。两种方法检测 SM 耐药性的符合率为 94.00%，一致性良好，WGS 具有较大临床应用潜力。由于 AMK 和 KAN 耐药菌株数量少，虽然两种检测方法符合率＞95.00%，但本研究结果仅供参考，其耐药机制与 rrs（Rvnr01）、eis（Rv2416c）和 whiB7 等基因突变有关[33]。值得注意的是，本研究 CPM 耐药检测一致性极差，主要是因为共有 27 例 CPM 表型耐药，只有 1 株发生 rrs 1401A＞G 基因突变。有研究显示，氨基糖苷类药物 SM 和 CPM 的耐药机制相似，导致两种药物之间存在有交叉耐药的可能[34-35]。MTB 对 SM 耐药主要由 rpsL（编码核糖体蛋白 S12）、rrs（编码 16S 核糖体 RNA）和 gidB（编码 7-甲基鸟苷甲基转移酶）等基因突变引起[36]。DST 有 27 例 CPM 表型耐药株中有 3 株存在 rrs 514A＞C，同时 SM 表型耐药；4 株存在 rpsL K43R，同时 SM 表型耐药；1 株存在 gid 第 351 位碱基 G 缺失，但 SM 表型敏感。CPM 与 SM 存在交叉耐药，可能部分解释 WGS 检测 CPM 耐药性与 DST 一致性差的原因，但这差异也可能与其他耐药机制有关。因此，需要进一步明确地阐述 CPM 耐药机制，以及其与 SM 交叉耐药共同关联的基因突变类型，可能有助于提升 WGS 检测 CPM 耐药的能力。

此外 CLO、PAS 和 ETH 3 种药物一致性均较差主要都是因为表型耐药但未检测到耐药相关基因突变株数相对较多，CLO 有 9 株，但其中 9 株 CLO 中有 1 株发生 Rv1979c V426I 基因突变，Rv1979c 与 CLO 耐药相关[37]。但以往研究中未发现 V426I 位点突变，因此值得进一步研究。PAS 有 5 株，ETH 有 15 株。这 3 种药物一致性差不能从基因突变层面解释，说明很有可能存在其他的耐药机制，当然，也可能受到检测方法的影响，比如这 3 种药物的 DST 重复性差。

综上所述，与传统的表型 DST 方法相比，WGS 耗时更短，WGS 对不同抗结核药物耐药性的检测能力有所差异，其对 RIF、RFB、SM、MFX、OFX 和 LFX 6 种药物耐药性检测较佳，而检测其他抗结核药物耐

药性仍存在一定缺陷,需要进一步明确相关药物的详细耐药机制,并对 WGS 用于耐药性分析的标准化进行探索。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2020[EB/OL]. (2020-10-15)[2022-07-22]. https://apps.who.int/iris/handle/10665/336069.

[2] World Health Organization. Policy framework for implementing new tuberculosis diagnostics[R]. Geneva:World Health Organization,2010.

[3] BOLGER A M,LOHSE M,USADEL B. Trimmomatic:a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics,2014,30(15):2114-2120.

[4] DEMOND H,HANNA C W,CASTILLO-FERNANDEZ J,et al. Multi-omics analyses demonstrate a critical role for EHMT1 methyltransferase in transcriptional repression during oogenesis[J]. Genome Res,2023,33(1):18-31.

[5] PHELAN J E,O'SULLIVAN D M,MACHADO D,et al. Integrating informatics tools and portable sequencing technology for rapid detection of resistance to anti-tuberculous drugs[J]. Genome Med,2019,11(1):41.

[6] COLL F,MCNERNEY R,PRESTON M D,et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences[J]. Genome Med,2015,7(1):51.

[7] UNISSA A N,SUBBIAN S,HANNA L E,et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Genet Evol,2016,45(1):474-492.

[8] 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]. 实用心脑肺血管病杂志,2019. 27(11):107-110.

[9] JIA H,CHU H,DAI G,et al. Rv1258c acts as a drug efflux pump and growth controlling factor in Mycobacterium tuberculosis[J]. Tuberculosis(Edinb),2022,133(1):102172.

[10] 刘羽暄,贾思凯,李志雄,等. 结核分枝杆菌对氨基水杨酸耐药的分子机制及研究进展[J]. 寄生虫与感染性疾病杂志,2020,18(2):107-110.

[11] GÓMEZ-GONZÁLEZ P J,CAMPINO S,PHELAN J E,et al. Portable sequencing of Mycobacterium tuberculosis for clinical and epidemiological applications[J]. Brief Bioinform,2022,23(5):bbac256.

[12]《中国防痨杂志》编辑委员会,中国医疗保健国际交流促进会结核病防治分会基础学组和临床学组. 结核分枝杆菌耐药性检测专家共识[J]. 中国防痨杂志,2019,41(2):129-37.

[13] 宋华峰,赵静,胥萍. 荧光定量 PCR 在结核分枝杆菌快速诊断中的研究[J]. 中国热带医学,2018,18(7):687-690.

[14] 胡春梅,郭晶,严虹,等. 荧光定量 PCR 探针熔解曲线法在结核分枝杆菌耐药基因检测中的应用[J]. 中国防痨杂志,2016,38(1):38-41.

[15] 李晓非,梁桂亮,普冬,等. 基因芯片技术在分枝杆菌菌种鉴定和结核耐药性检测中的应用及评价[J]. 中国实验诊断学,2015,14(2):204-207.

[16] 张洁,任怡宣,潘丽萍,等. 全基因组测序在结核分枝杆菌研究中的应用[J]. 中国防痨杂志,2020,42(7):737-740.

[17] 刘银萍,王杰,张俊仙,等. 结核分枝杆菌 rpoB 基因突变与三种利福霉素类抗结核药物耐受相关性研究[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(11):982-985.

[18] LIU D,HUANG F,ZHANG G,et al. Whole-genome sequencing for surveillance of tuberculosis drug resistance and determination of resistance level in China[J]. Clin Microbiol Infect,2022,28(5):731.

[19] POULTON N C,ROCK J M. Unraveling the mechanisms of intrinsic drug resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12(1):997283.

[20] CAO B,MIJITI X,DENG L L,et al. Genetic characterization conferred co-resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis isolates from Southern Xinjiang,China[J]. Infect Drug Resist,2023,16(1):3117-3135.

[21] DA SILVA D A,FERREIRA N V,REGO A M,et al. Integrated analysis of ethionamide resistance loci in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates[J]. Tuberculosis (Edinb),2018,113(1):163-174.

[22] UNISSA A N,SUBBIAN S,HANNA L E,et al. Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Genet Evol,2016,45(1):474-492.

[23] VILCHÈZE C,JACOBS W R J R. Resistance to isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis:genes,mutations,and causalities[J]. Microbiol Spectr,2014,2(4):MGM2-0014-2013.

[24] WANG T,JIAO W W,SHEN A D. Progress on mechanism of ethambutol resistance in Mycobacterium Tuberculosis[J]. Yi Chuan,2016,38(10):910-917.

[25] XU Y,JIA H,HUANG H,et al. Mutations found in embCAB,embR,and ubiA genes of ethambutol-sensitive and resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from China[J]. Biomed Res Int,2015,2015(1):951706.

[26] ENGSTRÖM A,MORCILLO N,IMPERIALE B,et al. Detection of first-and second-line drug resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates by pyrosequencing[J]. J Clin Microbiol,2012,50(6):2026-2033.

[27] CHENG S,CUI Z,LI Y,et al. Diagnostic accuracy of a molecular drug susceptibility testing method for the antituberculosis drug ethambutol:a systematic review and

meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(8): 2913-2924.
[28] PLINKE C, WALTER K, ALY S, et al. Mycobacterium tuberculosis embB codon 306 mutations confer moderately increased resistance to ethambutol in vitro and in vivo[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 2891-2896.
[29] MAYER C, TAKIFF H. The molecular genetics of fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Microbiol Spectr, 2014, 2(4): MGM2-0009-2013.
[30] BERNARD C, VEZIRIS N, BROSSIER F, et al. Molecular diagnosis of fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(3): 1519-1524.
[31] ZHU C, ZHANG Y, SHEN Y, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Shanghai, China[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(3): 260-263.
[32] 陈燕梅，温文沛，吴惠忠，等. 2016—2020 年广东省结核病耐药监测结果分析[J]. 中国防痨杂志，2022，44(7)：685-689.
[33] WEI W, ZHAO Y, ZHANG C, et al. Whole-genome sequencing and transcriptome-characterized in vitro evolution of aminoglycoside resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. Microb Genom, 2023, 9(5): mgen001022.
[34] ZHAO J, WEI W J, YAN H M, 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.
[35] JNAWALI H N, YOO H, RYOO S, et al. Molecular genetics of Mycobacterium tuberculosis resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2013, 29(6): 975-982.
[36] ROCHA D M G C, VIVEIROS M, SARAIVA M, et al. The neglected contribution of Streptomycin to the tuberculosis drug resistance problem[J]. Genes(Basel), 2021, 12(12): 2003.
[37] ZHANG S, CHEN J, CUI P, et al. Identification of novel mutations associated with clofazimine resistance in Mycobacterium tuberculosis[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(9): 2507-2510.

（收稿日期：2023-07-12　修回日期：2023-12-01）

（上接第 377 页）

[10] MODESTINO E J, REINHOFER A, BLUM K, et al. Hoehn and Yahr staging of Parkinson's disease in relation to neuropsychological measures[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2018, 23(7): 1370-1379.
[11] 徐珊瑚，林阁，朱银花，等. 蒙特利尔认知评估量表在帕金森病伴轻度认知功能障碍患者中的应用研究[J]. 中国康复医学杂志，2015，30(3)：251-254.
[12] BAIANO C, BARONE P, TROJANO L, et al. Prevalence and clinical aspects of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: a meta-analysis[J]. Mov Disord, 2020, 35(1): 45-54.
[13] 于月华，赵德豪，丁萍，等. 帕金森病合并脑白质病变的认知功能障碍患者定量脑电观察[J]. 中华老年心脑血管病杂志，2021，23(9)：900-903.
[14] LIU Z, CHEUNG H H. Stem cell-based therapies for parkinson disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8060.
[15] 吴林，张光彩，周晓晖，等. 针刺联合西药对肝肾阴虚型帕金森病患者 NT-3、IGF-1、DA 及炎性因子水平的影响[J]. 上海针灸杂志，2021，40(7)：814-819.
[16] KREMER T, TAYLOR K I, SIEBOURG-POLSTER J, et al. Longitudinal analysis of multiple neurotransmitter metabolites in cerebrospinal fluid in early parkinson's disease[J]. Mov Disord, 2021, 36(8): 1972-1978.
[17] CHO S S, STRAFELLA A P, DUFF-CANNING S, et al. The relationship between serotonin-2a receptor and cognitive functions in nondemented parkinson's disease patients with visual hallucinations[J]. Mov Disord Clin Pract, 2017, 4(5): 698-709.
[18] 廖丹，许丽. 不同分期老年帕金森病认知功能水平与外周血 γ-氨基丁酸(GABA)及血尿酸水平相关性研究[J]. 中国实验诊断学，2020，24(11)：1791-1794.
[19] HIRANO S. Clinical implications for dopaminergic and functional neuroimage research in cognitive symptoms of Parkinson's disease[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 40.
[20] ARMAND S, OZENNE B, SVART N, et al. Brain serotonin transporter is associated with cognitive-affective biases in healthy individuals[J]. Hum Brain Mapp, 2022, 43(13): 4174-4184.
[21] 韩玲娜，王春雷，常永丽，等. 电损毁外侧缰核对帕金森病模型大鼠空间学习记忆功能的影响及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版)，2021，47(5)：1108-1115.
[22] HORI H, YOSHIMURA R, KATSUKI A, et al. Blood biomarkers predict the cognitive effects of aripiprazole in patients with acute schizophrenia[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(3): 568.
[23] COEN R F, ROBERTSON D A, KENNY R A, et al. Strengths and limitations of the MoCA for assessing cognitive functioning: findings from a large representative sample of Irish older adults[J]. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2016, 29(1): 18-24.

（收稿日期：2023-06-10　修回日期：2023-09-16）