

结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变与 氟喹诺酮类药物体外最低抑菌浓度的关系

张海晴¹, 陈效友², 周冬青¹, 张雪迪¹, 张礼茂¹,
魏素梅¹, 刘成永¹, 黄海滨¹, 贾彤¹

(1. 江苏省徐州市传染病医院 结核科, 江苏 徐州, 221004;
2. 首都医科大学附属北京胸科医院 结核科, 北京, 101149)

摘要: 目的 探讨结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变与氟喹诺酮类药物体外最低抑菌浓度(MIC)的关系。方法 收集640例痰结核分枝杆菌阳性临床分离株,用探针熔解曲线法筛选 *gyrA* 基因耐药决定区突变株,对其 *gyrA* 基因耐药决定区进行测序,并检测氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星及加替沙星对不同突变位点菌株的MIC,分析其差异。结果 探针熔解曲线法筛选出 *gyrA* 突变株共45株(7.03%),其中90位点突变15株(33.33%)、94位点突变26株(57.78%)、91位点突变4株(8.89%)。90位点突变菌株中,氧氟沙星高水平耐药2株,左氧氟沙星无耐药,莫西沙星低水平耐药3株、高水平耐药2株,加替沙星高水平耐药3株;91位点突变菌株中,氧氟沙星、左氧氟沙星无耐药,莫西沙星高水平耐药2株,加替沙星高水平耐药1株;94位点突变菌株中,氧氟沙星低水平耐药4株、高水平耐药7株,左氧氟沙星低水平耐药7株,莫西沙星低水平耐药2株、高水平耐药13株,加替沙星低水平耐药3株、高水平耐药14株。除左氧氟沙星外,90位点突变菌株对其他3种药物易出现高水平耐药;91位点突变菌株对莫西沙星易出现高水平耐药;94位点突变菌株对莫西沙星、加替沙星多为高水平耐药,其中天冬酰胺(Asp)→天冬酰胺(Asn)和 Asp→甘氨酸(Gly)突变类型的菌株更易出现。结论 结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变类型与氟喹诺酮类药物MIC相关,可为临床用药提供重要参考。

关键词: 结核分枝杆菌; 氟喹诺酮类药物; 最低抑菌浓度; 基因突变; *gyrA* 基因

中图分类号: R 378.91; R 915 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)14-004-05 DOI: 10.7619/jcmp.20210716

Relationship between *gyrA* gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and the minimum inhibitory concentration of fluoroquinolones *in vitro*

ZHANG Haiqing¹, CHEN Xiaoyou², ZHOU Dongqing¹, ZHANG Xuedi¹,
ZHANG Limao¹, WEI Sumei¹, LIU Chengyong¹, HUANG Haibin¹, JIA Tong¹

(1. Department of Tuberculosis, Xuzhou Infectious Disease Hospital in Jiangsu Province, Xuzhou,
Jiangsu, 221004; 2. Department of Tuberculosis, Beijing Chest Hospital Affiliated to Capital
Medical University, Beijing, 101149)

Abstract: Objective To explore the relationship between *gyrA* gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* and the minimum inhibitory concentration (MIC) of fluoroquinolones *in vitro*. **Methods** Clinical isolated positive strains of *Mycobacterium tuberculosis* in 640 patients were collected. The probe solubility curve was used to screen strains with mutation of *gyrA* gene in the drug resistance determining region, and sequencing of the drug resistance determining region was performed. The MICs of ofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin and gatifloxacin for strains with mutations at different loci were detected, and the differences were analyzed. **Results** A total of 45 strains (7.03%) with *gyrA* gene mutation were screened out by the probe solubility curve, including 15 (33.33%) with the codon 90 mutation, 26 (57.78%) with the codon 94 mutation, and 4 (8.89%) with the codon 91 mutation. Among strains with the codon 90 mutation, 2 strains showed high resistance to ofloxacin, no levofloxacin-resistant strains were found, 3 showed low resistance to moxifloxacin, 2 showed high resistance to moxifloxacin,

and 3 showed high resistance to gatifloxacin. Among strains with the codon 91 mutation, no ofloxacin or levofloxacin-resistant strains were found. Two strains showed high resistance to moxifloxacin, and 1 showed high resistance to gatifloxacin. Among strains with the codon 94 mutation, 4 strains showed low resistance and 7 showed highly resistant to ofloxacin, 7 showed low resistance to levofloxacin, 2 showed low resistance and 13 showed high resistance to moxifloxacin, 3 showed low resistance and 14 showed high resistance to gatifloxacin. For strains with the codon 90 mutation, except for levofloxacin, they were all highly resistant to the other drugs. Strains with the codon 91 mutation were prone to have high resistance to moxifloxacin, and strains with the codon 94 mutation were mostly highly resistant to moxifloxacin and gatifloxacin, especially those with Aspartic acid (Asp)→Asparagine (Asn) and Asp→Glycine (Gly). **Conclusion** The type of gyrA gene mutation in *Mycobacterium tuberculosis* is related to the MICs of fluoroquinolones, which provides important reference for clinical medication.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; fluoroquinolones; minimum inhibitory concentration; gene mutation; gyrA gene

中国是全球 30 个结核病高负担国家之一,尽管近年来结核病发病的绝对数和发病率均缓慢下降,但耐药问题日益严重^[1]。《耐药结核病化学治疗指南(2019 年简版)》^[2]提出,在耐多药结核病化学治疗方案中,临床应优先选择高代氟喹诺酮类药物。目前认为氟喹诺酮类药物耐药机制主要为耐药基因决定区(QRDR) gyrA 基因或 gyrB 基因的突变,其中 QRDR 的 gyrA 基因突变是最主要机制,可解释 60%~90% 的耐药表型^[3-4],故分析不同 gyrA 基因突变类型的菌株对氟喹诺酮类药物的最低抑菌浓度(MIC)可为结核病的药物治疗提供参考依据。本研究以结核分枝杆菌临床分离株作为研究样本,检测其 gyrA 基因耐药决定区突变情况,并分析其与氟喹诺酮类药物 MIC 的关系,旨在为结核病的临床治疗提供指导。

1 材料与方 法

1.1 菌株

收集江苏省徐州市传染病医院 2017 年 10 月—2019 年 10 月分离的 640 株痰结核分枝杆菌阳性临床分离株作为研究标本,结核分枝杆菌标准株(H37Rv)来自江苏省疾控中心结核病实验室保存株(ATCC27294 号)。

1.2 试剂

结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药基因检测试剂盒(福建厦门致善生物有限公司,国械注准 20163401457),左氧氟沙星(BA7020)、氧氟沙星(BA7014)、加替沙星(BA7026-1)、莫西沙星(BA7022)药敏试剂盒均购自珠海贝索生物公司,

Alamar blue 显色液(美国伯乐生命医学有限公司, BUF012B)。

1.3 菌株基因组 DNA 模板制备

采用煮沸法提取菌株基因组 DNA。采用标准接种环收集细菌 2~3 环,转移至含 250 μ L DNA 提取液的无菌 Eppendorf 离心管中,反复吹打重悬细菌;菌液 100 $^{\circ}$ C 20 min 煮沸灭活,以 12 000 g 离心 10 min,取上清液于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 聚合酶链反应(PCR)-探针熔解分析法

① 体系: 2 \times FQ PCR Mix(含扩增引物、FAM 标记的耐药突变位点检测探针、4 \times dNTP、PCR 缓冲液、ddH₂O) 19.6 μ L, 0.4 μ L TB 酶混合液(UNG 酶及 taq DNA 聚合酶),样本 DNA 5 μ L。② 条件: UNG 酶处理,50 $^{\circ}$ C 2 min,变性 90 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 65 $^{\circ}$ C 20 s(每个循环下降 1 $^{\circ}$ C), 78 $^{\circ}$ C 25 s, 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 61 $^{\circ}$ C 15 s(检测荧光), 78 $^{\circ}$ C 15 s, 循环 45 次,荧光通道选用 FAM 和 HEX; 熔解分析程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 40 $^{\circ}$ C 2 min, 40~85 $^{\circ}$ C(每 1 $^{\circ}$ C 采集 FAM 和 HEX 通道荧光信号),循环 1 次。③ 结果分析: 通过比较样品及阳性对照熔解曲线 Tm 值差异确定样品是否发生突变,与阳性对照熔点一致判定为野生型,低于阳性对照 2 $^{\circ}$ C 以上判定为突变型。

1.5 PCR 扩增及测序

对 PCR-探针熔解分析法检测到的对氟喹诺酮类药物耐药的菌株进行 gyrA 基因扩增及测序,基因扩增引物序列为^[5]上游引物 5'-TGACATCGA

GCAGGAGATGC-3'、下游引物 5'-GGGCTTCGGT-GTACCTCATC-3'，测序由上海康黎医学检验所完成，采用 BLAST 网站将测序结果与标准菌株基因序列进行比较。

1.6 药物 MIC 测定

采用微孔板稀释法对筛选出的 *gyrA* 基因突变菌株进行结核分枝杆菌菌株 MIC 的检测。① 梯度浓度药物微孔板的制备：设置氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、加替沙星药物的浓度梯度为 0.001 5、0.003、0.006、0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、16.000、32.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。② MIC 检测：菌株已提前培养 2 ~ 3 周，将液体培养基以 4 000 g 离心 15 min，取沉淀，采用无菌盐水稀释至 1 个麦氏浓度，按 1:100 稀释后向微孔板加入 100 μL 菌液，将微孔板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育，培养 48 h 后查看有无污染，确定无异常后孵育至 7 d，在对照孔中细菌生长良好的前提下读取抑制结核菌可见生长的最小浓度，若样本孔内浓度小于临界浓度，则判定为敏感，大于相应的值则判为耐药，抑制结核分枝杆菌生长的最低药物浓度为最低 MIC。耐药标准^[5-8]：氧氟沙星或左氧氟沙星的耐药临界点浓度为 <2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，低水平耐药为 4.0 ~ <8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，高水平耐药为 $\geq 8.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；莫西沙星耐药临界点浓度为 <0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，低水平耐药为 1.0 ~ <2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，高水平耐药为 $\geq 2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；加替沙星耐药临界点浓度为 <1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，低水平耐药为 2.0 ~ <4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，高水平耐药为 $\geq 4.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析数据，不同突变类型菌株耐药率、MIC 的比较采用卡方检验或 Fisher 精确检验，检验水准 $\alpha = 0.05$ ， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结核分枝杆菌菌株 *gyrA* 基因突变情况分析

640 株痰菌阳性临床分离株中共检测到 *gyrA* 基因突变株 45 株 (7.03%)，其中 94 位点突变 26 株 (57.78%)、90 位点突变 15 例 (33.33%)、91 位点突变 4 株 (8.89%)。90 位点氨基酸变化为丙氨酸 (Ala) \rightarrow 缬氨酸 (Val)，91 位点氨基酸变化为丝氨酸 (Ser) \rightarrow 脯氨酸 (Pro)，94 位点氨基酸变化为天冬氨酸 (Asp) \rightarrow 酪氨酸 (Tyr)、Asp \rightarrow 天冬酰胺 (Asn)、Asp \rightarrow Ala、Asp \rightarrow 甘氨酸 (Gly)。

见表 1。

表 1 结核分枝杆菌分离株 *gyrA* 基因突变情况分析

位点	突变类型	氨基酸变化	菌株数/株	占比/%
90	gCg \rightarrow gTg	Ala \rightarrow Val	15	33.33
91	Tcg \rightarrow Ccg	Ser \rightarrow Pro	4	8.89
94	Gac \rightarrow Tac	Asp \rightarrow Tyr	4	8.89
	Gac \rightarrow Aac	Asp \rightarrow Asn	6	13.33
	gAc \rightarrow gCc	Asp \rightarrow Ala	6	13.33
	gAc \rightarrow gGc	Asp \rightarrow Gly	10	22.22

Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸; Ser: 丝氨酸; Pro: 脯氨酸; Asp: 天冬氨酸; Tyr: 酪氨酸; Asn: 天冬酰胺; Gly: 甘氨酸。

2.2 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的氧氟沙星耐药情况

90 位点突变菌株和 94 位点突变为 Tyr、Asn、Gly 的菌株检出氧氟沙星高水平耐药。见表 2。

2.3 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的左氧氟沙星耐药情况

各位点突变菌株均未检出左氧氟沙星高水平耐药，94 位点突变为 Tyr、Asn、Gly 的菌株检出左氧氟沙星低水平耐药。见表 3。

2.4 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的莫西沙星耐药情况

90 位点、91 位点突变菌株和 94 位点突变为 Tyr、Asn、Gly、Ala 的菌株均检出莫西沙星高水平耐药菌株，其中 91 位点突变菌株和 94 位点突变为 Tyr、Asn、Gly 的菌株高水平耐药检出率 $\geq 50\%$ 。见表 4。

2.5 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的加替沙星耐药情况

90 位点、91 位点突变菌株和 94 位点突变为 Tyr、Asn、Gly、Ala 的菌株检出加替沙星高水平耐药菌株，其中 91 位点突变为 Tyr、Asn、Gly 的菌株高水平耐药检出率 $\geq 50\%$ 。见表 5。

3 讨论

WANG Z 等^[9]报道，202 株临床分离株中，15 株 (7.4%) 出现氧氟沙星耐药，其中有 12 株发生 *gyrA* 基因突变。本研究从徐州地区 640 例痰菌阳性临床分离株中检测到 45 株 (7.03%) *gyrA* 基因突变菌株，其中 90 位点突变 15 株、91 位点突变 4 株、94 位点突变 26 株，与相关研究^[10-11]报道结果相似。

本研究结果显示，45 株 *gyrA* 基因突变株对氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星和加替沙星的低水平耐药与高水平耐药比例分别为 4:9、7:0、5:17

表 2 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的氧氟沙星耐药情况 [$n(\%)$]

突变类型	菌株数/株	表型 DST		氧氟沙星 MIC/($\mu\text{g/mL}$)					
		低水平耐药菌株	高水平耐药菌株	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000
90Ala→Val	15	0	2(13.33)	4(26.67)	9(60.00)	0	2(13.33)	0	0
91Ser→Pro	4	0	0	0	4(100.00)	0	0	0	0
94Asp→Tyr	4	0	1(25.00)	0	3(75.00)	0	1(25.00)	0	0
94Asp→Asn	6	2(33.33)	2(33.33)	0	2(33.33)	2(33.33)	2(33.33)	0	0
94Asp→Ala	6	0	0	0	6(100.00)	0	0	0	0
94Asp→Gly	10	2(20.00)	4(40.00)	1(10.00)	3(30.00)	2(20.00)	2(20.00)	2(20.00)	0

Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸; Ser: 丝氨酸; Pro: 脯氨酸; Asp: 天冬氨酸; Tyr: 酪氨酸; Asn: 天冬酰胺; Gly: 甘氨酸; MIC: 最低抑菌浓度。

表 3 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的左氧氟沙星耐药情况 [$n(\%)$]

突变类型	菌株数/株	表型 DST		左氧氟沙星 MIC/($\mu\text{g/mL}$)						
		低水平耐药菌株	高水平耐药菌株	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000
90Ala→Val	15	0	0	0	8(53.33)	5(33.33)	2(13.33)	0	0	0
91Ser→Pro	4	0	0	0	0	4(100.00)	0	0	0	0
94Asp→Tyr	4	2(50.00)	0	0	0	2(50.00)	2(50.00)	0	0	
94Asp→Asn	6	3(50.00)	0	0	0	2(33.33)	1(16.67)	3(50.00)	0	0
94Asp→Ala	6	0	0	0	0	2(33.33)	4(66.67)	0	0	0
94Asp→Gly	10	2(20.00)	0	0	0	4(40.00)	4(50.00)	2(20.00)	0	0

Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸; Ser: 丝氨酸; Pro: 脯氨酸; Asp: 天冬氨酸; Tyr: 酪氨酸; Asn: 天冬酰胺; Gly: 甘氨酸; MIC: 最低抑菌浓度。

表 4 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的莫西沙星耐药情况 [$n(\%)$]

突变类型	菌株数/株	表型 DST		莫西沙星 MIC/($\mu\text{g/mL}$)						
		低水平耐药菌株	高水平耐药菌株	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000
90Ala→Val	15	3(20.00)	2(13.33)	6(40.00)	4(26.67)	3(20.00)	0	2(13.33)	0	0
91Ser→Pro	4	0	2(50.00)	0	2(50.00)	0	0	2(50.00)	0	0
94Asp→Tyr	4	0	2(50.00)	0	2(50.00)	0	0	2(50.00)	0	0
94Asp→Asn	6	0	4(66.67)	0	2(33.33)	0	0	4(66.67)	0	0
94Asp→Ala	6	2(33.33)	2(33.33)	0	2(33.33)	2(33.33)	0	2(33.33)	0	0
94Asp→Gly	10	0	5(50.00)	0	5(50.00)	0	0	2(20.00)	3(30.00)	0

Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸; Ser: 丝氨酸; Pro: 脯氨酸; Asp: 天冬氨酸; Tyr: 酪氨酸; Asn: 天冬酰胺; Gly: 甘氨酸; MIC: 最低抑菌浓度。

表 5 不同类型 *gyrA* 基因突变菌株的加替沙星耐药情况 [$n(\%)$]

突变类型	菌株数/株	表型 DST		加替沙星 MIC/($\mu\text{g/mL}$)							
		低水平耐药菌株	高水平耐药菌株	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000
90Ala→Val	15	0	3(20.00)	7(46.67)	1(6.67)	3(20.00)	1(6.67)	0	3(20.00)	0	0
91Ser→Pro	4	0	1(25.00)	1(25.00)	1(25.00)	0	1(25.00)	0	1(25.00)	0	0
94Asp→Tyr	4	1(25.00)	2(50.00)	0	1(25.00)	0	0	1(25.00)	2(50.00)	0	0
94Asp→Asn	6	0	4(66.67)	1(16.67)	1(16.67)	0	0	0	4(66.67)	0	0
94Asp→Ala	6	1(16.67)	2(33.33)	0	2(33.33)	0	1(16.67)	1(16.67)	2(33.33)	0	0
94Asp→Gly	10	1(10.00)	6(60.00)	2(20.00)	0	0	1(10.00)	1(10.00)	4(40.00)	2(20.00)	0

Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸; Ser: 丝氨酸; Pro: 脯氨酸; Asp: 天冬氨酸; Tyr: 酪氨酸; Asn: 天冬酰胺; Gly: 甘氨酸; MIC: 最低抑菌浓度。

和 3:18。由此可见, 4 种药物中, 氧氟沙星、莫西沙星和加替沙星主要表现为高水平耐药, 而左氧氟沙星仅表现为低水平耐药。CHERNYAEVA E^[12] 等报道, 32 例 *gyrA* 突变及氧氟沙星耐药菌株中, 低水平耐药与高水平耐药的比例为 12:20, 与本研究结果相似。本研究还发现, 90、91 和 94 位点突变菌株对左氧氟沙星均为低水平耐药, 与相关研究^[13] 报道的 94Asp→Asn/Tyr、94Asp→Gly、94Asp→His 突变菌株为高水平耐药的的结果不同, 这可能与该研究检测出的耐药菌株数量偏少

和地区差异有关。CHIEN J Y 等^[7] 报道, 15 株 94Asp→Gly 突变菌株中有 12 株为高水平耐药, 这与本研究结论一致。

相关研究^[14] 表明, 氟喹诺酮类药物耐药基因 *gyrA* 基因突变主要发生在结核分枝杆菌的 QRDR, 多数位于基因保守区 67~106 位点, 本研究显示 *gyrA* 基因突变主要发生于 90 位点、91 位点和 94 位点, 其中 94 位点突变最多, 与其他报道结果类似。不同耐药基因位点的突变与结核分枝杆菌耐药水平存在一定差异^[15-16], 90 位点及

94 位点氨基酸突变可引起结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物的高水平耐药^[17]。本研究发现,以 94 位点突变为例,94 位点 Asp 突变为 Asn、Gly、Tyr 的菌株更易对除左氧氟沙星以外的 3 种药物表现出高水平耐药,提示这些氨基酸突变是引起结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物高水平耐药的因子。相关研究^[18]报道,94 位点 Asp 突变为 Gly、半胱氨酸、Asn 等可引起高水平耐药,而突变为 Ala、Tyr 可引起低水平耐药。分析原因,可能是氨基酸性质的改变影响了耐药性,Gly、Asn 均为非电离极性氨基酸,而 Ala、Tyr 等氨基酸为非极性,与原 94 位点氨基酸 Asp 性质相似,故对耐药性的影响较小,耐药浓度变化不明显^[19]。

本研究以痰菌阳性临床分离株为研究对象,研究范围更广,适用于普通痰菌阳性患者,具有广泛的应用价值。本研究应用探针熔解曲线法对结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物 *gyrA* 基因耐药决定区突变进行检测初步筛选耐药株,与传统药敏试验和基因测序相比,具有简便、快速、准确的优点,有利于早期判断患者是否耐药。对探针熔解曲线法检测的耐药株进行基因测序检测不同耐药位点,不必对每一个痰菌阳性株都进行测序,提高了效率,节约了成本,也为研究结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变类型与氟喹诺酮类药物耐药的关系提供了一种科学、简便的研究方法。采用 MicroDSTTM 微孔板方法测定 MIC,与传统比例法相比具有快速、准确、简便的优势。分析研究结果后,结合患者临床,对于低水平耐药患者可通过适当加大药物剂量来提高治疗效果。尽管目前已有较多研究证实 *gyrA* 基因突变为结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药的主要机制,但仍有部分耐药株未能检测到突变,这可能与 *gyrB* 基因突变有关,或因为部分突变发生在 QRDR 以外区域。因此,临床对 *gyrB* 基因耐药决定区及其他区域耐药机制的探索仍需进一步深入^[20-21]。

综上所述,结核分枝杆菌 *gyrA* 基因突变与氟喹诺酮类药物耐药水平及 MIC 密切相关,其中以 94 位点基因突变最多。检测菌株的基因突变类型可预测患者对氟喹诺酮类药物的耐药水平,从而为结核病患者治疗方案的选择提供依据。但本研究存在一定局限性,如样本数量较少,且仅涉及 *gyrA* 基因突变,未对其他耐药机制及耐药基因进行分析,未来仍需扩大样本量并拓展研究范围深入探讨,从而为结核病的临床用药提供重要参考。

参考文献

- [1] 王淑霞,高微微. 耐药肺结核的诊断与治疗[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(10): 681-683.
- [2] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2019年简版)[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(10): 1025-1073.
- [3] CHANG C M, SHIH H I, WU C J, *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* from nursing home residents in Taiwan: correlation of MICs and mutations in QRDRs[J]. *J Appl Microbiol*, 2020, 128(6): 1624-1633.
- [4] ROY B, TOUSIF AHAMED S K, BANDYOPADHYAY B, *et al.* Development of quinolone resistance and prevalence of different virulence genes among *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* in environmental water samples[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2020, 71(1): 86-93.
- [5] SIRGEL F A, WARREN R M, STREICHER E M, *et al.* *gyrA* mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(5): 1088-1093.
- [6] ORGANIZATION W H. Policy Guidance on Drug-Susceptibility Testing (DST) of second-line antituberculosis drugs[J]. World Health Organization, 2008, 8(11): 524.
- [7] CHIEN J Y, CHIEN S T, CHIU W Y, *et al.* Moxifloxacin improves treatment outcomes in patients with ofloxacin-resistant multidrug-resistant tuberculosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(8): 4708-4716.
- [8] IMPERIALE B R, DI GIULIO Á B, ADRIÁN CATALDI A, *et al.* Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* cross-resistance to isoniazid, rifampicin and levofloxacin with their respective structural analogs[J]. *J Antibiot: Tokyo*, 2014, 67(11): 749-754.
- [9] WANG Z, XIE T, MU C, *et al.* Performance of sequencing in predicting ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* from positive bactec MGIT 960 cultures[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(1): 69-74.
- [10] 孟繁荣,杨瑜,雷杰,等. 中国氟喹诺酮耐药结核分枝杆菌 *gyr* 基因序列特征分析[J]. 实用医学杂志, 2020, 36(11): 1503-1508.
- [11] HAMEED H M A, TAN Y, ISLAM M M, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of levofloxacin-and moxifloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Southern China[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(11): 4613-4625.
- [12] CHERNYAIEVA E, FEDOROVA E, ZHEMKOVA G, *et al.* Characterization of multiple and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with different ofloxacin-resistance levels[J]. *Tuberculosis*, 2013, 93(3): 291-295.
- [13] KAMBLI P, AJBANI K, NIKAM C, *et al.* Determination of MICs of levofloxacin for *Mycobacterium tuberculosis* with *gyrA* mutations[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015, 19(10): 1227-1229.

- tions in 195 countries, 1990 – 2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): 1191 – 1210.
- [7] TOIVONEN L, KARPPINEN S, SCHUEZ – HAVUPALO L, *et al.* Burden of recurrent respiratory tract infections in children: a prospective cohort study [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2016, 35(12): e362 – e369.
- [8] DE OLIVEIRA T B, KLERING E A, DA VEIGA A B G. Is recurrent respiratory infection associated with allergic respiratory disease? [J]. *J Asthma*, 2019, 56(2): 160 – 166.
- [9] 韩菲, 戴锦程, 孙杭, 等. 224 例肺炎链球菌感染患儿临床特征及耐药分析 [J]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2019, 13(5): 357 – 361.
- [10] 全守东, 乐原, 杜振元, 等. 肺炎支原体感染哮喘患儿血清 CD40L 和 VCAM-1 水平及意义 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(22): 3474 – 3478.
- [11] ODDY W H. Breastfeeding, childhood asthma, and allergic disease [J]. *Ann Nutr Metab*, 2017, 70(Suppl 2): 26 – 36.
- [12] ESPOSITO S, SOTO-MARTINEZ M E, FELESZKO W, *et al.* Nonspecific immunomodulators for recurrent respiratory tract infections, wheezing and asthma in children: a systematic review of mechanistic and clinical evidence [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2018, 18(3): 198 – 209.
- [13] 胡燕, 毛萌. 重视过敏性疾病高风险儿童的早期筛查 [J]. *临床儿科杂志*, 2020, 38(12): 881 – 883.
- [14] SAHIN O N, YAPRAK P, GÜLEN F, *et al.* Mold hypersensitivity in children with frequent respiratory tract infection and prolonged cough attacks [J]. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg*, 2014, 24(4): 195 – 199.
- [15] DABANIYASTI D, EKSI F, KESKIN Ö, *et al.* An investigation into respiratory tract viruses in children with acute lower respiratory tract infection or wheezing [J]. *Minerva Pediatr*, 2020, 72(1): 45 – 54.
- [16] 巫伟生, 李斯, 张必旗, 等. 肺炎支原体感染不同病期婴幼儿免疫功能及炎症因子的动态变化 [J]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2019, 13(1): 54 – 59.
- [17] SANDOVAL JURADO L, JIMÉNEZ BÁEZ M V, OLIVARES JUÁREZ S, *et al.* Breastfeeding, complementary feeding and risk of childhood obesity [J]. *Aten Primaria*, 2016, 48(9): 572 – 578.
- [18] VERSPORTEN A, BIELICKI J, DRAPIER N, *et al.* The Worldwide Antibiotic Resistance and Prescribing in European Children (ARPEC) point prevalence survey: developing hospital-quality indicators of antibiotic prescribing for children [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(4): 1106 – 1117.
- [19] AHMADZAR F, VIJVERBERG S J H, ARETS H G M, *et al.* Early life antibiotic use and the risk of asthma and asthma exacerbations in children [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2017, 28(5): 430 – 437.
- [20] O'DWYER D N, DICKSON R P, MOORE B B. The lung microbiome, immunity, and the pathogenesis of chronic lung disease [J]. *J Immunol*, 2016, 196(12): 4839 – 4847.

(本文编辑: 周冬梅)

(上接第 8 面)

- [14] ABDELAZEEM W M, ZOLNIKOV T R, MOHAMMED Z R, *et al.* Virulence, antimicrobial resistance and phylogenetic analysis of zoonotic walking pneumonia *Mycoplasma arginini* in the one-humped camel (*Camelus dromedarius*) [J]. *Acta Trop*, 2020, 207: 105500.
- [15] HUO F, MA Y, LI S, *et al.* Specific gyrA gene mutations correlate with high prevalence of discordant levofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, China [J]. *J Mol Diagn*, 2020, 22(9): 1199 – 1204.
- [16] KORNE-ELENBAAS J D, POL A, VET J, *et al.* Simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and fluoroquinolone resistance mutations to enable rapid prescription of oral antibiotics [J]. *Sex Transm Dis*, 2020, 47(4): 238 – 242.
- [17] JIAN M J, CHENG Y H, CHUNG H Y, *et al.* Fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Elizabethkingia anophelis*: phenotypic and genotypic characteristics of clinical isolates with topoisomerase mutations and comparative genomic analysis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2019, 74(6): 1503 – 1510.
- [18] 张治国, 杜春英, 张倩. 我国结核分枝杆菌 gyrA 不同突变类型对氟喹诺酮类药物耐药水平的相关性研究 [J]. *中国防痨杂志*, 2016, 38(9): 706 – 711.
- [19] 高敏, 杨婷婷, 李桂莲, 等. 基于全基因组测序的我国耐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.
- [20] EDWARDS B D, EDWARDS J, COOPER R, *et al.* Incidence, treatment, and outcomes of isoniazid mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections in Alberta, Canada from 2007 – 2017 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0229691.
- [21] XU Z, CAVE R, CHEN L, *et al.* Antibiotic resistance and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* recovered from hospital personnel in China [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 22: 195 – 201.

(本文编辑: 陆文娟)