

福建省结核分枝杆菌多位点可变数目串联重复序列基因分型研究

梁庆福 陈求扬 林淑芳 林建 逢宇 赵永 魏淑贞 王玉锋 郑金凤 赵雁林

【摘要】 目的 了解福建省结核分枝杆菌的多位点可变数目串联重复序列基因分型(MLVA)的特征。方法 选择15个可变数目串联重复位点(VNTR),检测福建省30个耐药监测点临床分离的结核菌株,结果使用BioNumerics(Version 4.5)软件进行聚类分析。结果 313株结核菌被分为9个基因群(I~IX),分别包含220、9、48、2、1、3、10、10、10株菌,以I群为主(70.3%, 220/313);I群菌株异烟肼、链霉素、乙胺丁醇和耐多药的耐药率与其他基因群的差异无统计学意义($P>0.05$),但利福平(RFP)耐药率为33.2%(73/220),明显高于其他群菌株RFP的耐药率20.4%(19/93),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 福建省结核分枝杆菌菌株存在明显的基因多态性,以I群菌株为主,并与RFP耐药性具有相关性,应加强此类菌株流行的监测。

【关键词】 结核分枝杆菌;多位点可变数目串联重复序列;基因分型

Preliminary study on the MLVA genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Fujian province LIANG Qing-fu¹, CHEN Qiu-yang¹, LIN Shu-fang¹, LIN Jian¹, PANG Yu², ZHAO Yong¹, WEI Shu-zhen¹, WANG Yu-feng², ZHENG Jin-feng^{1,3}, ZHAO Yan-lin². 1 Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China; 2 National Tuberculosis Reference Laboratory, National Center for TB Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Teaching Base of Fujian Medical University

Corresponding author: ZHENG Jin-feng, Email: Zhjf_8888@126.com

This work was supported by grants from the Science Foundation Project from Fujian Province (No. 2010J01116) and Youth Grant Program Foundation from Ministry of Health of Fujian Province (No. 2009-2-36).

【Abstract】 Objective To preliminarily understand the genotyping characteristics regarding the variable number tandem repeats (VNTR) of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates so as to provide evidence for the development of tuberculosis control and prevention programs in Fujian province. **Methods** Fifteen VNTR locus sets were used to detect the clinical isolates from the fifth surveillance project on tuberculosis resistance, in Fujian province. BioNumerics version 4.5 were used to analyze the cluster from the results generated by genotyping. **Results** 313 *Mycobacterium tuberculosis* isolates were divided into 9 clusters, including I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII and IX, with the number of 220, 9, 48, 2, 1, 3, 10, 10, 10 isolates, respectively. Cluster I was the major lineage, accounting for 70.3% (220/313) of the total. Resistance rates of cluster I isolates to isoniazid, streptomycin, ethambutol and multi-drug-resistant were not statistically different from other clusters ($P>0.05$). However, resistance rate to rifampicin (RFP) was significantly higher than that of other isolates of the clusters, 33.2% (73/220) vs. 20.4% (19/93) ($P<0.05$). **Conclusion** The strains isolated from Fujian province showed significant polymorphism on genotyping. Cluster I seemed to be the dominant, calling for the close monitoring program on cluster I strains. Results from our initial studies demonstrated the existence of significant correlation between cluster I strains and drug resistance to RFP.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Multiple loci VNTR analysis; Genotyping

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.11.016

基金项目:福建省自然科学基金(2010J01116);福建省卫生厅青年科研课题(2009-2-36)

作者单位:350001 福州,福建省疾病预防控制中心(梁庆福、陈求扬、林淑芳、林建、赵永、魏淑贞、郑金凤);中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心国家结核病参比实验室(逢宇、王玉锋、赵雁林);福建省医科大学教学基地(郑金凤)

通信作者:郑金凤, Email: Zhjf_8888@126.com

结核分枝杆菌基因分型研究是结核病分子流行病学监测和控制的基础,可鉴定流行病学相关分离菌株的型,以确定传染源及发现新流行菌株,是研究主要流行株的基础。本研究采用多位点可变数目串联重复序列基因分型(multiple loci VNTR analysis, MLVA)方法,对福建省313株结核分枝杆菌进行基因分型,以了解福建地区结核分枝杆菌的基因型种类和特征。

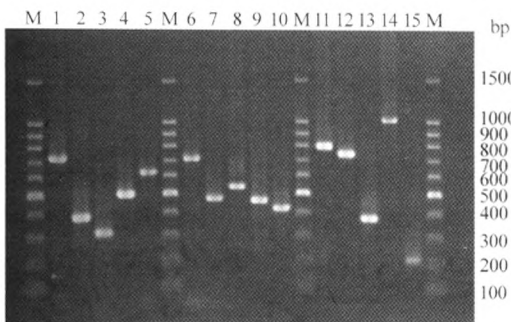
材料与方 法

1. 菌株和试剂:选取2008—2011年福建省30个结核病耐药性监测点分离的结核分枝杆菌313株,所有菌株的获得均得到患者知情同意。结核分枝杆菌标准株H37Rv(ATCC27294)由国家结核病参比室提供。2×PCR-Mix(2倍PCR预混液),100 bp DNA Ladder,均购自Genestar公司,琼脂糖购自基因公司,引物由上海生工生物有限公司合成。

2. 结核分枝杆菌DNA的制备:将临床分离株常规接种于L-J培养基,37℃培养2~4周,至有菌落生长后,取一菌环菌于400 μl TE中悬菌,100℃煮沸15 min,12 000 r/min离心10 min,上清液用于基因分型实验。

3. MLVA 检测:

(1)引物设计与合成:据参考文献[1,2]和细菌基因数据库,初步筛选15个串联重复基因位点(图1)。引物由上海生工基因技术有限公司合成。



注:M:分子质量标准;1: Mtub 04; 2: ETRC; 3: MIRU 04 (ETRD); 4: MIRU 40; 5: MIRU 10; 6: MIRU 16; 7: Mtub 21; 8: QUB-11b; 9: ETRA; 10: Mtub 30; 11: MIRU 26; 12: MIRU 31 (ETRE); 13: Mtub 39; 14: QUB-26; 15: QUB-4156c

图1 福建省1株结核分枝杆菌菌株的15个不同VNTR位点的多态性检测

(2)反应体系和条件:采用20 μl反应体系,其中含上、下游引物各0.5 μl (10 μmol/L),2×Taq PCR MasterMix 10 μl, DNA模板2 μl,双蒸水7 μl补充至反应体积。PCR反应条件:预变性94℃ 5 min;变

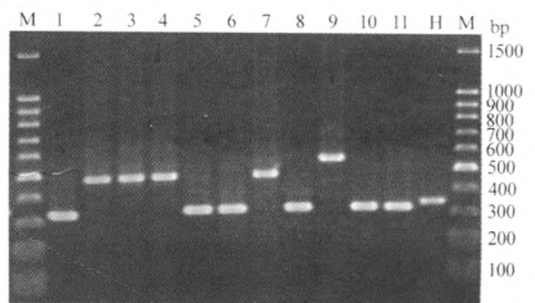
性94℃ 1 min,退火58℃ 1 min,延伸72℃ 1 min,35个循环;终延伸72℃ 10 min;4℃保存。

(3)检测和分析:取3 μl扩增产物,在2%的琼脂糖凝胶上电泳,电泳电压采用10 V/cm,电泳40 min,将凝胶放入浓度为0.5 μg/ml的EB染色液中,染色30 min,自来水脱色5 min,在紫外凝胶成像分析系统下观察结果,用100 bp DNA Marker来确定相对分子质量的大小,以标准菌株H37Rv作为对照。采用Gel-Pro analyzer 4.0软件(Media Cybernetics公司,美国)对凝胶进行数字化处理,将指纹图谱数字化,再用BioNumerics (Version 4.5)数据库软件(Applied Maths,比利时)进行聚类分析,将实验菌株进行分型处理。

结 果

1. 一般情况:313株菌中分离自初治患者244株,复治患者69株;男性226株,女性87株;患者年龄15~81岁。

2. VNTR 多态性检测:本研究共选取15个VNTR基因位点对313株结核分枝杆菌菌株进行基因分型。结果显示不同菌株的DNA指纹图谱呈现出明显多态性(图1、2)。



注:M:分子质量标准;H:H37Rv;1~11:临床分离株

图2 福建省部分结核分枝杆菌菌株在ETRD位点多态性检测

3. 聚类分析:313株菌经软件聚类分析后被分为9个(I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX)基因群,分别包含菌株220、9、48、2、1、3、10、10、10株菌,其中最大的基因群I群占70.3%(220/313);在株水平分类上313株菌被分为283个基因型,其中成簇的菌株数为54株,最大的6簇包括3株,其他18簇为两株独立成簇,成簇率为17.2%(54/313),其余259株为单菌株独立基因型(图3)。

4. I群菌株特征:在I群菌株中,40.9%(90/220)耐药,其中33.6%(74/220)耐异烟肼(INH),33.2%(73/220)耐利福平(RFP),25.4%(56/220)耐链

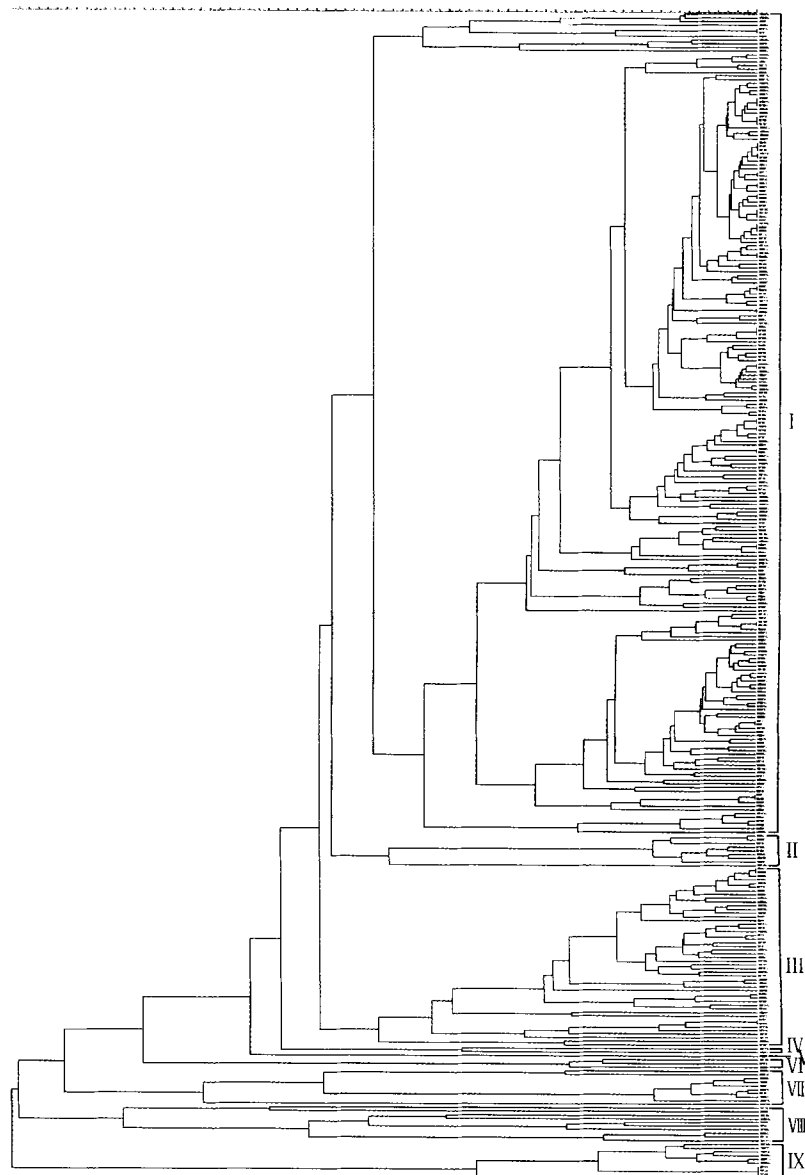


图3 福建省313株结核分枝杆菌VNTR基因分型聚类分析

霉素(SM), 17.7%(39/220)耐乙胺丁醇(EMB), 30.4%(67/220)耐多药(MDR), INH、SM、EMB和MDR的耐药率与其他基因群的差异无统计学意义, 但RFP的耐药率明显高于其他基因群, 差异有统计学意义($P < 0.05$), I群菌株与其他基因群相比在性别方面差异也无统计学意义(表1)。

5. 菌株地区分布: 福建省不同地区间结核分枝杆菌VNTR基因型存在差异, 但均以I群为主(表2)。闽南地区菌株基因群为I、II、III、IV、VI、VII、VIII、IX, 闽东地区为I, 闽西北地区为I、VIII, 闽中地区为I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX。

讨论

结核分枝杆菌基因分型方法中以MLVA基因

分型是目前应用较多且成熟的方法^[1-8]。与其他方法相比较, MLVA基因分型具有操作简便, 稳定性及重复性好, 检测结果数字化利于相互比较的优点。

本研究313株结核分枝杆菌菌株来自30个耐药监测点, 具有较好的代表性。所选15个VNTR位点分析组合也较福建省以往有关研究所用的12个VNTR位点分析组合分辨率高^[9], 分型结果更准确、可靠, 能更好地对主要的流行株进行有效的辨析^[2,3,8]。结果表明所有菌株可被分成9个主要基因群, 大部分菌株属于I群(220株, 70.3%), 说明这些菌株属于一个亲缘关系很近的克隆系, 可能为福建省的主要流行菌株, 应加强对这类菌株的研究和监测。分析不同地区间结核分枝杆菌VNTR基因型特征, 发现存在一定差异, 但均以I群为主。

以往研究表明北京家族菌株占优势可能与其耐药性有关, 在越南菌株耐药性与北京家族有联系^[10]。我国最近大样本研究也表明北京基因型目前仍然是我国主要流行基因型, 且与耐RFP、氧氟沙星和MDR有关^[11]。

通过分析发现, 本研究中I群菌株RFP的耐药率明显高于其他基因群, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此, 笔者认为I群菌株在福建省的流行可能与其耐RFP而形成选择性优势株有关。以往研究发现福建省北京基因型菌株呈较高水平流行^[12], 本次研究未同时进行Spoligotyping方法比较分析, I群菌株是否为北京家族, 尚有待进一步研究。

(感谢国家结核病参比实验室对本研究的大力帮助)

参考文献

- [1] Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2006, 44(12):4498-4510.
- [2] Wang J, Huang YF, Zhang AH, et al. Genotyping of 101

表1 福建省313株结核分枝杆菌I基因群与患者性别和耐药的相关性分析

| 特征 | 基因群(株数) | | OR值(95%CI) | $\chi^2(P)$ 值 |
|-----|---------|----|----------------------|---------------|
| | I | 其他 | | |
| 性别 | | | 0.937(0.544 ~ 1.615) | 0.055(0.814) |
| 男 | 158 | 68 | | |
| 女 | 62 | 25 | | |
| INH | | | 1.119(0.665 ~ 1.882) | 0.178(0.673) |
| 耐药 | 74 | 29 | | |
| 敏感 | 146 | 64 | | |
| RFP | | | 1.934(1.086 ~ 3.444) | 5.122(0.024) |
| 耐药 | 73 | 19 | | |
| 敏感 | 147 | 74 | | |
| SM | | | 0.754(0.442 ~ 1.285) | 1.084(0.298) |
| 耐药 | 56 | 29 | | |
| 敏感 | 164 | 64 | | |
| EMB | | | 1.216(0.625 ~ 2.365) | 0.332(0.565) |
| 耐药 | 39 | 14 | | |
| 敏感 | 181 | 79 | | |
| MDR | | | 1.706(0.955 ~ 3.047) | 3.296(0.069) |
| 是 | 67 | 19 | | |
| 否 | 153 | 74 | | |

表2 福建省313株结核分枝杆菌VNTR基因分型及其地区分布

| 基因群 | 菌株数 | | | | 合计 |
|------|-----|----|-----|----|-----|
| | 闽南 | 闽东 | 闽西北 | 闽中 | |
| I | 139 | 6 | 6 | 69 | 220 |
| II | 8 | 0 | 0 | 1 | 9 |
| III | 34 | 0 | 0 | 14 | 48 |
| IV | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| V | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| VI | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| VII | 8 | 0 | 0 | 2 | 10 |
| VIII | 5 | 0 | 2 | 3 | 10 |
| IX | 9 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| 合计 | 206 | 6 | 8 | 93 | 313 |

注:闽南地区为厦门、泉州、漳州市;闽东地区为宁德市;闽西北地区为龙岩、三明、南平市;闽中地区为福州、莆田市

Mycobacterium tuberculosis isolates from pediatrics tuberculosis in Chongqing by multiple locus VNTR analysis. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(13):1408-1410. (in Chinese)

王均,黄延凤,张爱华,等. 儿童结核病101例临床分离结核分枝杆菌多位点串联重复序列分型. 第三军医大学学报, 2011, 33(13):1408-1410.

[3] Jiao WW, Sun GZ, Mokrousov I, et al. Evaluation of new variable-number tandem-repeat systems for typing *Mycobacterium tuberculosis* with Beijing genotype isolates from Beijing, China. J Clin Microbiol, 2008, 46(3):1045-1049.

[4] Zhang L, Chen J, Shen X, et al. Highly polymorphic variable-number tandem repeats loci for differentiating Beijing genotype strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai, China.

FEMS Microbiol Lett, 2008, 282(1):22-31.

[5] Shi L, Yang M, Pourcel C, et al. Genotyping study of 216 *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from the patients in Tibet with MLVA and Spoligotyping. Chin J Microbiol Immunol, 2007, 27(8):711-718. (in Chinese)

石荔,杨敏,Christine Pourcel,等. MLVA和Spoligotyping用于西藏地区216株结核分枝杆菌临床分离株的基因分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(8):711-718.

[6] Wang XM, Lv B, Liu ZW, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Zhejiang province with spacer oligonucleotide typing and multiple loci variable number tandem repeat analysis. Chin J Zoonoses, 2008, 24(12):926-929. (in Chinese)

王晓萌,吕冰,柳正卫,等. Spoligotyping和MLVA用于71株浙江省结核分枝杆菌临床分离株基因分型的初步研究. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(12):926-929.

[7] Wang J, Liu Y, Zhang CL, et al. Genotypes and characteristics of clustering and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Heilongjiang province, China. J Clin Microbiol, 2011, 49(4):1354-1362.

[8] Liu RX, Li QZ, Xing LL, et al. Genotyping of 210 *Mycobacterium tuberculosis* strains with Spoligotyping and MIRU-VNTR among pediatric tuberculosis patients in Chongqing. Chin J Epidemiol, 2011, 32(6):593-597. (in Chinese)

刘芮汐,李奇志,幸琳琳,等. MIRU-VNTR和Spoligotyping用于重庆地区210株儿童结核分枝杆菌临床分离株的基因分型. 中华流行病学杂志, 2011, 32(6):593-597.

[9] Jiang Y, Zhang LS, Zhao XQ, et al. Preliminary genotyping in 105 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from Fujian province by variable number tandem repeat analysis. Chin J Zoonoses, 2007, 23(1):1-4. (in Chinese)

蒋毅,张丽水,赵秀芹,等. MLVA技术用于福建105株结核分枝杆菌基因分型的初步研究. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(1):1-4.

[10] Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. Emerg Infect Dis, 2006, 6(3):302-305.

[11] Pang Y, Xia H, Jiang GL, et al. Genotyping and drug resistance analysis of *Mycobacterium tuberculosis* from China. Chin J Lab Med, 2011, 34(11):1023-1028. (in Chinese)

逢宇,夏辉,姜广路,等. 中国结核分枝杆菌寡核苷酸基因分型及其耐药性分析. 中华检验医学杂志, 2011, 34(11):1023-1028.

[12] Liang QF, Chen QY, Zhao Y, et al. Analysis of the DNA fingerprinting features of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 in She-nationality of Fujian province. Chin J Zoonoses, 2008, 24(10):926-929. (in Chinese)

梁庆福,陈求扬,赵永,等. 福建省畲族人群结核分枝杆菌IS6110 DNA指纹图谱特征分析. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10):926-929.

(收稿日期:2012-05-25)

(本文编辑:张林东)