

## 深圳市结核分枝杆菌异烟肼耐药流行株的基因分析

崔运勇 王峰 刘小立 桂静 胡思玉 杨慧

【关键词】 结核分枝杆菌; 耐药; 异烟肼

**Analysis of the epidemical INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by DNA sequencing in Shenzhen** CUI Yun-yong<sup>1,2</sup>, WANG Feng<sup>1</sup>, LIU Xiao-li<sup>1</sup>, GUI Jing<sup>1</sup>, HU Si-yu<sup>3</sup>, YANG Hui<sup>1</sup>. 1 Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China; 2 Department of Immunology, Nanchang University; 3 School of Life Sciences, Xiamen University  
Corresponding author: YANG Hui, Email: yh2009cn@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Mega-projects of China (No. 2008ZX10003-004).

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Drug-resistance; Isoniazid

异烟肼 (INH) 和利福平 (RFP) 是抗结核药中的一线药物, 近年来出现了大量耐药结核分枝杆菌, 在中国 INH 耐药率高达 17.6%<sup>[1]</sup>。INH 耐药相关的最主要基因为 *katG*, 其次为 *inhA*、*ahpC* 和 *inhA94*。为了解深圳地区 INH 耐药流行株的主要基因突变类型, 本研究对深圳地区 303 株结核分枝杆菌的 *katG*、*inhA*、*oxyR-ahpC* 基因进行序列分析。

## 1. 材料与方法:

(1) 材料: 303 株结核分枝杆菌保存于深圳市慢性病防治中心, INH 购自美国 Sigma 公司。

(2) 菌株准备: 参照世界卫生组织/国际防痨和肺病联合会 (WHO/IUATLD) 标准, 对筛选出的菌株, 使用 L-J 药敏培养基, 1% 比例法药敏试验重复测定其耐药性, 方法参照文献 [2], 选择药敏结果稳定的菌株作为此次实验研究菌株。

(3) DNA 提取: 取实验室保存的 303 份菌株转种培养后, 置于 100 °C 水浴箱中煮沸灭活 20 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为 DNA 模板, 沉淀保留, 置 -20 °C 冰箱中保存。

(4) 引物设计: 参照文献 [3], 由上海英峻生物工程有限公司合成。

(5) DNA 测序及分析: 将所提取的 DNA 进行 PCR 扩增、纯化及测序。测序方法为双脱氧末端终止法。PCR 扩增条件为: 预变性 95 °C 5 min, 变性 95 °C 10 s, 退火 58 °C 20 s,

延伸 72 °C 25 s, 共 30 个循环, 最终延伸 72 °C 10 min, 4 °C 保存。采用 Blastn 进行序列比对。

2. 结果: 303 株临床分离株中, 150 株为耐药株和 153 株为敏感株。INH 耐药株、敏感株突变率分别为 92.0% (138/150)、27.5% (42/153)。INH 耐药株中 *katG* 突变率为 74.7% (112/150), *inhA* 突变率为 16.7% (25/150), *ahpC* 突变率为 16.0% (24/150)。*katG* 315 位 AGC→ACC 突变率为 65.3% (98/150), AGC→AAC 突变率为 3.3% (5/150), AGC→ASC 突变率为 1.3% (2/150), AGC→AGG 突变率为 0.7% (1/150); *inhA* 启动子区域突变率 12.0% (18/150), 其中 -15 位突变共有 15 株, 占 10.0% (15/150), -18 位 A→W 共 3 株, 占 2.0% (3/150); 未发现 *inhA94* 突变株; *ahpC* 启动子区域突变位点较分散, 分别为: -6 位 4 株、-9 位 5 株、-10 位 5 株、-12 位 1 株和 -30 位 1 株。敏感株突变的主要位点是 *katG* 283 位 GAT→GWT; *inhA* 83 T→W, 94-95 插入 G; *ahpC* 852-853 插入 C, 853 A→W, 另外在敏感株中分别有 1 株 *katG* 315 位 AGC→ACC 和 1 株 *inhA* -8 位 T→G 突变。

3. 讨论: 本次测序发现深圳地区 INH 耐药株中 74.7% (112/150) 突变位点在 *katG* 基因上, 315 位有 AGC→ACC、AAC 和 AGG 三种突变类型, 共 106 株, 占 *katG* 突变的 94.6% (106/112)。值得一提的是, INH 敏感株中有 1 株也存在 *katG* 315 位突变, 其他文献中也有类似报道<sup>[4]</sup>, 说明 *katG* 315 位突变不能百分之百指示 INH 耐药。另外, 2 株的 *katG* 片段经 PCR 反复扩增仍未成功, 推测可能存在 *katG* 基因缺失, 该基因缺失可导致 INH 的耐药。耐药株 *inhA* 启动子区域突变率为 12.0% (18/150), 其中 -15 位 C→T 占总数的 10.0% (15/150)。有报道发现 *inhA94* 与 INH 耐药相关, 但本次研究未发现 *inhA94* 位有特异性突变。*ahpC* 基因突变耐药株中 16 株发生 *ahpC* 启动子区突变, 分别位于 -6、-9、-10、-12、-30 位点。敏感株中未发现启动子突变, 而 42 株 *ahpC* 编码区突变中有 31 株发生于敏感株, 结果说明 *ahpC* 启动子突变与 INH 耐药性关联, 而编码区突变可能与 INH 耐药性无关。INH 耐药株中 8.67% (13/150) 未发现任何突变。综上所述, 研究表明深圳地区 MTB 流行菌株 *katG* 315 基因、*inhA* 与 *ahpC* 基因的启动子区突变是 INH 耐药性产生的主要分子机制。

## 参 考 文 献

- [1] The technique steering group of national TB epidemical sample survey, the office of national TB epidemical sample survey. The national sample survey report of TB epidemic situation in 2000. Chin J Antituberculosis, 2002, 24: 65. (in Chinese)  
全国结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.11.027

基金项目: 国家科技重大专项 (2008ZX10003-004)

作者单位: 518020 深圳市慢性病防治中心 (崔运勇、王峰、刘小立、桂静、杨慧); 南昌大学医学院免疫学教研室 (崔运勇); 厦门大学生命科学学院 (胡思玉)

通信作者: 杨慧, Email: yh2009cn@yahoo.com.cn

中国防痨杂志, 2002, 24: 65.

[2] The basic commission of Chinese Antituberculosis Association. The standard protocol of laboratory diagnosis of TB. Beijing: China Education and Culture Press, 2006: 49-51. (in Chinese)  
中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 49-51.

[3] Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro

susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. BMC Microbiol, 2009, 9: 39.

[4] Kim SY, Park YJ, Kim WI, et al. Molecular analysis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from South Korea. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003, 47(3): 497-502.

(收稿日期: 2010-04-13)

(本文编辑: 万玉立)

## 双重巢式 PCR 监测外环境水中霍乱弧菌结果分析

陈爱平 杨劲松 徐海滨 董新平 罗朝晨 阙飙 王多春

【关键词】 霍乱弧菌; 监测; 巢式 PCR

**Surveillance of environmental specimens on *Vibrio cholerae* by duplex nested PCR** CHEN Ai-ping<sup>1</sup>, YANG Jin-song<sup>1</sup>, XU Hai-bin<sup>1</sup>, DONG Xin-ping<sup>1</sup>, LUO Chao-chen<sup>1</sup>, KAN Biao<sup>2</sup>, WANG Duo-chun<sup>2</sup>. 1 Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fujian 350001, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: WANG Duo-chun, Email: wangduochun@icdc.cn

This work was supported by grants from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z425), National Natural Science Foundation of China (No. 30872260) and Key Projects of Science and Technology for Infectious Diseases of Science and Technology of China (No. 2008ZX10004-012).

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Surveillance; Nested PCR

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中只有产生霍乱肠毒素(CT)的 O1 及 O139 血清群能够引起腹泻和霍乱流行。监测外环境的霍乱弧菌有助于追踪霍乱的传播趋势<sup>[1]</sup>。由于外环境存在的大量非致病霍乱弧菌及其他杂菌,分离培养数量相对较低的致病霍乱弧菌十分困难。本研究建立双重巢式 PCR 方法,用以鉴定致病霍乱弧菌<sup>[2]</sup>,并于 2007 年 6 月至 2008 年 6 月,对福州地区闽江以及白马河水中霍乱弧菌按月进行动态监测。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.11.028

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA02Z425); 国家自然科学基金(30872260); 科技部传染病重大专项(2008ZX10004-012)

作者单位: 350001 福州,福建省疾病预防控制中心(陈爱平、杨劲松、徐海滨、董新平、罗朝晨); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(阙飙、王多春)

通信作者: 王多春, Email: wangduochun@icdc.cn

### 1. 材料与与方法:

(1) 监测点的选择: 根据 2005 年福建省霍乱流行时福州市病例集中分布的白马河(福州市区内河)沿线及外排闽江水域点的上下游一定范围内设定 11 个监测点。

(2) 样品的采集及霍乱弧菌培养: 2007 年 6 月至 2008 年 6 月, 每月对选定的监测点采集一次水样。霍乱弧菌培养依据《霍乱防治手册》(1999 年)进行。采样同时测定采样点的水体温度。

(3) DNA 模板的制备: 取 1 ml 过夜培养物, 利用细菌基因组(北京天根生化科技有限公司)试剂盒提取 DNA。

(4) 双重巢式 PCR: 引物、扩增方法及结果判断参照文献[2]。以 O1 群和 O139 群 O 抗原编码基因(*rfb*)为目的基因, 检测 O1 群和 O139 群霍乱弧菌的在外环境水中的分布情况。*ctxA* 基因扩增的外侧引物序列参照文献[3], 内侧引物序列参照文献[4]。

### 2. 结果:

(1) *rfb* 检测: 共采样 371 份, *rfb* 阳性标本共 67 份(18.06%), 包括 O1-*rfb* 阳性标本 37 份(9.97%), O139-*rfb* 阳性标本 30 份(8.09%); *ctxA* 阳性标本 8 份(2.16%)。

(2) 时间分布: 2007 年 6-12 月 *rfb* 阳检率为 16.24%, 其中 O1-*rfb* 阳检率为 5.58%, O139-*rfb* 阳检率为 10.66%; 2008 年 1-6 月 *rfb* 阳检率为 20.11%, 其中 O1-*rfb* 阳检率为 14.94%, O139-*rfb* 阳检率为 5.17%。阳检率高的时段是 5-9 月, 其中 2007 年 9 月和 2008 年 5 月最高, 分别为 48.30% 和 50.00%。除 2007 年 12 月和 2008 年 2、3 月未检出 *rfb* 外, 其他月份均检出。

(3) 水温与样品 *rfb* 检出率的关系: 样品水温的高低与霍乱弧菌增长的关系存在一定规律性。5-10 月, 水温较高, 波动范围在 21~28℃, *rfb* 阳检率相对较高。

(4) 闽江和白马河霍乱弧菌 *rfb* 及 *ctxA* 检测结果比较: 2007 年 6 月至 2008 年 6 月, 闽江 7 个监测点共采集样本 238 份, *rfb* 阳性标本为 26 份(10.92%); 白马河 4 个监测点共采集样本 133 份, *rfb* 阳性标本为 41 份(30.82%), 经  $\chi^2$  检验,  $P <$