

· 临床研究 ·

79 株结核分支杆菌基因分型研究及耐药相关分析*

陈 志¹, 陈 佳^{2△}, 先德强¹, 周 云¹, 郑幸福¹, 江智辉¹

(1. 四川省绵阳市疾病预防控制中心 621000; 2. 四川省绵阳市中心医院儿科 621000)

摘要:目的 通过多位点可变数目串联重复序列(MLVA)分型方法,结合流行病学资料,探讨绵阳地区结核分支杆菌的基因型特征,为本地结核病的防治研究提供科学依据。方法 收集结核分支杆菌菌株和患者资料,采用国际上推荐的 15 个可变串联重复序列位点进行基因分型,应用 BioNumerics(Version 5.0)软件进行聚类分析,药物敏感性试验采用比例法,率的比较采用 χ^2 检验。结果 共对 79 株结核分支杆菌进行了基因检测,结果显示高度的基因多态性。QUB-11b、MIRU26、Mtub 21 和 MIRU 16 分辨能力更高(HGI>0.7),位点 MIRU 4、ETR-A 和 ETR-C 显示分辨能力相对较低(HGI<0.4)。79 株菌分为 7 个基因群,以 III 群和 V 群为主,III 群占 46.8%,V 群占 41.8%,其它群所含菌株较少。复治患者在 III 群、V 群和其他群中所占比例分别为 32.43%、21.21%和 11.11%,差异无统计学意义($P>0.05$)。V 群中菌株耐药率高达 36.36%,明显高于 III 群(10.81%)和其他群(11.11%),差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 初步证实绵阳地区结核分支杆菌具有明显的基因多态性,主要流行型为 III 群和 V 群,主要耐药型为 V 群,应加强 III 群和 V 群菌株的流行监控,加强 V 群菌株的耐药性监测。

关键词:结核分支杆菌;基因分型;耐药

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.23.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)23-2358-03

Study on genotyping and drug-resistance analysis of 79 Mycobacterium tuberculosis*Chen Zhi¹, Chen Jia^{2△}, Xian Deqiang¹, Zhou Yun¹, Zheng Xinfu¹, Jiang Zhihui¹

(1. Center for Disease Control and Prevention of Mianyang City, Mianyang, Sichuan 621000, China;

2. Department of Paediatrics, Central Hospital of Mianyang City, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To establish the molecular characteristics of Mycobacterium tuberculosis by multiple locus variable numbers of tandem repeats(MLVA) genotyping technique and epidemiologic data for providing scientific basis to prevent and control tuberculosis. **Methods** M. tuberculosis clinical isolates and the patients' data were collected. The polymorphism of 15 VNTR loci which were commended was tested, clustering of genotype was analyzed with BioNumerics(Version 5.0), and drug susceptibility testing was performed using proportion method. Statistical analysis was performed with Chi Square Test. **Results** 79 M. tuberculosis clinical isolates were analyzed respectively; the results showed that there were obvious polymorphisms of VNTRs. The discrimination power of QUB-11b, MIRU26, Mtub 21 and MIRU 16 loci was high(HGI>0.7), otherwise the MIRU 4, ETR-A and ETR-C was low(HGI<0.4). The clustering of genotype showed that these strains could be categorized into 7 gene clusters, in which the proportions of cluster III and cluster V were the biggest, 46.8% were cluster III and 41.8% were cluster V, other clusters were of scattered distribution. The rate of re-treated patients in the III, V and other clusters patients was 32.43%, 21.21% and 11.11% respectively; there was no statistical significance($P>0.05$). The drug resistance rate of V clusters strain(36.36%) was obviously higher than III (10.81%) and other clusters(11.11%), the differences was statically significant($P<0.05$). **Conclusion** There are obvious polymorphisms of VNTRs of M. tuberculosis clinical strains preliminarily in Mianyang area. The main epidemic strains belong to cluster III and cluster V, the main drug resistance stains belong cluster V. It is suggested that epidemic surveillance of cluster III and cluster V stains, resistance surveillance of cluster V stains both needs to be strengthened.

Key words: mycobacterium tuberculosis; genotyping; drug resistance

结核病仍然是一种严重危害人类健康的重大传染病,已成为当前全社会主要公共卫生问题之一^[1]。据统计,绵阳地区结核患病率为 552/10 万,涂阳患病率为 220/10 万,分别高出全国平均水平 50.4%和 55.5%,属疫情严重地区之一。近年来,随着分子生物学技术的进步,以数目可变串联重复序列(variable number tandem repeats, VNTR)为分子标识而建立的多位点数目可变串联重复序列分析(multiple loci VNTR analysis, MLVA)技术由于操作简便、特异性好、重复性高、分辨率强、数字化结果易于比较,被美国疾病预防控制中心推荐为结核分支杆菌基因分型的首选方法,目前已广泛用于各地结核

分支杆菌基因分型的研究^[2-3]。

由于不同 VNTR 位点及其组合具有地区差异性,各国学者都致力于研究适合本地区的 VNTR 位点组合^[2-4]。本研究采用 MLVA 基因分型技术,选取国际上推荐的 15 个 VNTR 位点^[5],对绵阳地区的 79 株结核分支杆菌进行了基因分型研究,以初步了解绵阳地区结核分支杆菌的基因型种类和特征,并结合流行病学资料,分析了初治与复治患者的基因群分布,探讨了基因群与耐药的关系。

1 资料与方法**1.1 一般资料** 79 例结核菌株分别来源于江油市和涪城区,

* 基金项目:四川省卫生计生厅课题资助项目(080213);绵阳市卫生局课题资助项目(200703)。△ 通讯作者, Tel: (0816)2247730; E-mail: chenjie_127@163.com.

其中江油 29 例,涪城 50 例。患者年龄 17~75 岁,平均 43.4 岁;男 61 例,女 18 例;初治 59 例,复治 20 例。小学以下文化程度 32 例,有肺结核病患者接触史者 11 例。

1.2 菌株来源 79 株结核分支杆菌菌株由绵阳江油市和涪城区临床痰标本中分离获得,分别命名为 MY001~MY079,由四川省疾病预防控制中心结核病预防控制所负责传代培养、鉴定和保存。收集患者的流行病学调查资料,包括性别、年龄、病史资料和菌株来源等。标准菌株 H37Rv 购自中国药品生物制品检定所。

1.3 主要试剂和仪器 Taq DNA 聚合酶、dNTP、Gold-View™ DNA 染料、琼脂糖和 100 bp DNA Marker 购自北京赛百盛公司;PCR 扩增仪,凝胶成像仪及 BioNumerics (Version 5.0) 分析软件。

1.4 药物敏感性试验 采用比例法对 4 种抗结核药物进行药敏试验,培养基内药物的终浓度分别为:异烟肼 0.2 μg/mL、链霉素 4 μg/mL、利福平 40 μg/mL、乙胺丁醇 2 μg/mL。耐药标准:含药培养基菌落数/对照培养基菌落数大于或等于 1% 为耐药。

1.5 基因分型 根据文献[5]选择 15 个串联重复基因位点并合成引物,引物由上海生工公司合成,结核分支杆菌 DNA 的制备参照文献[6]。VNTR 位点的 PCR 总体积为 25 μL,包括上、下游引物各 10 μmol/L 1.5 μL,1 mmol/L dNTP 5.0 μL,10×Taq DNA 酶 buffer 2.5 μL,1.5 mmol/L MgCl₂ 5 μL,3 U/μL Taq 酶 0.5 μL,模板 DNA 5 μL,三蒸水补充至反应体积。PCR 反应条件:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 62 °C 30 s,延伸 70 °C 45 s;共 35 个循环。最后延伸 72 °C,10 min。PCR 产物 4 °C 保存。取 5 μL 扩增产物,在 2% 琼脂糖凝胶(含 5 μL/100 mL GoldView™ DNA 染料)中电泳。

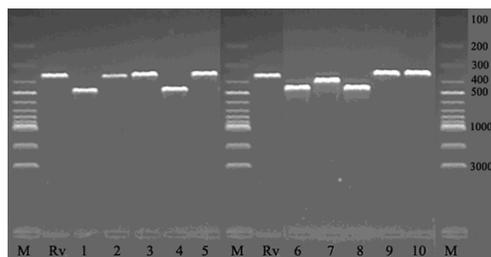
1.6 统计学处理 MIRU 各位点的分辨指数(hunter-gaston index, HGI)采用公式 $HGI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)^{[7]}$;检测菌株呈现的 PCR 扩增指纹经 Gel-Pro analyzer 3.1 软件数据化,通过与 H37Rv 进行比较,进一步确定每株菌每个 VNTR 特异位点重复单元的重复次数,重复次数输入 Excel 表格。再用 BioNumerics (Version 5.0) 数据库软件进行分析,聚类方式用平均连锁聚类法(UPGMA),根据 cluster-cut off 值差异进行基因分型。采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,运用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法进行组间差异比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VNTR 位点的基因多态性 79 株结核分支杆菌的 MIRU 基因分型结果显示,在 15 个 MIRU 位点中,位点 QUB-11b、MIRU 26、Mtub 21 和 MIRU 16 显示多态性较高,分辨指数(HGI)大于 0.7, QUB-11b 多态性最高(HGI 为 0.880);位点 MIRU 4、ETR-A 和 ETR-C 显示多态性相对较低(HGI 小于 0.4), ETR-C 多态性最低(HGI 为 0.234);其它 8 个位点显示中度程度的多态性(HGI 介于 0.4~0.7)。部分位点的电泳图见图 1~4。

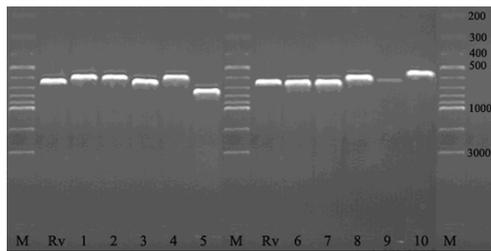
2.2 基因型聚类分析 经 BioNumerics 5.0 软件聚类分析,对 79 株结核分支杆菌分型后,共得到 7 个基因群。79 株菌株在各群中均有分布,其中以 III 群和 V 群所占比例较大, III 群含 37 株菌,占 46.8%; V 群含 33 株菌,占 41.8%。其它菌株呈散在分布, I 群、II 群和 VII 群各只含 1 株菌,各占 1.3%; IV 群含 4

株菌,占 5.0%; VI 群含 2 株菌,占 2.5%。每株菌株皆独特成型,有 79 个独特基因型。将 H37Rv 标准株同时进行聚类分析比对,结果发现 H37Rv 的基因型与所有菌株的基因型均不相同。江油地区 29 株菌中,只有 I 群没有分布,其他 6 个群中皆有分布。涪城地区 50 株菌中, II 群和 VII 群没有检出,其他 5 个群中都有检出,见表 1。III 群、V 群和其他群在涪城和江油两个地区的分布没有统计学差异($\chi^2 = 0.268, P = 0.875$)。



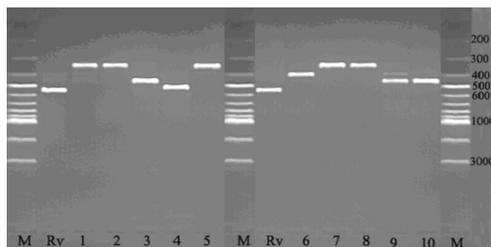
(标准菌株 H37Rv 的 PCR 产物为 383 bp,重复次数为 2,重复单元长度 58 bp)。M: DNA Marker; Rv: H37Rv; 1: MY059; 2: MY060; 3: MY061; 4: MY062; 5: MY063; 6: MY064; 7: MY065; 8: MY066; 9: MY067; 10: MY068。

图 1 不同菌株在 Mtub-30 位点多态检测结果



(标准菌株 H37Rv 的 PCR 产物为 643 bp,重复次数为 3,重复单元长度 53 bp)。M: DNA Marker; Rv: H37Rv; 1: MY060; 2: MY061; 3: MY062; 4: MY063; 5: MY064; 6: MY065; 7: MY066; 8: MY067; 9: MY068; 10: MY069。

图 2 不同菌株在 MIRU-10 位点多态检测结果



(标准菌株 H37Rv 的 PCR 产物为 562 bp,重复次数为 5,重复单元长度 58 bp)。M: DNA Marker; Rv: H37Rv; 1: MY035; 2: MY036; 3: MY037; 4: MY038; 5: MY039; 6: MY041; 7: MY042; 8: MY043; 9: MY044; 10: MY045。

图 3 不同菌株在 Mtub 39 位点多态检测结果

表 1 VNTR 基因分型结果及不同地区分布情况

地区	I	II	III	IV	V	VI	VII	合计
涪城	1	0	24	3	21	1	0	50
江油	0	1	13	1	12	1	1	29
合计	1	1	37	4	33	2	1	79

2.3 初、复治患者间的基因群分布 初治患者 7 个基因型群

均有检出,复治患者仅检出 3 个基因群。复治患者在Ⅲ群、V群和其他群中所占比例分别为 32.43%、21.21%和 11.11%。经统计学分析,两者分布差异无统计学意义,见表 2。

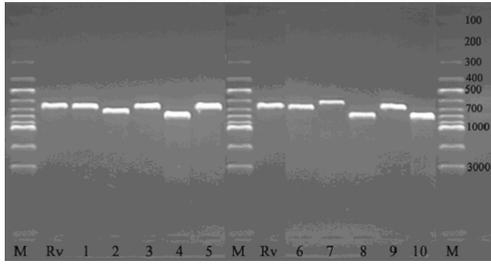


图 4 不同菌株在 MIRU 31/ETR E 位点多态检测结果
(标准菌株 H37Rv 的 PCR 产物为 651 bp,重复次数为 3,重复单元长度 53 bp)。M: DNA Marker; Rv: H37Rv; 1: MY038; 2: MY039; 3: MY040; 4: MY041; 5: MY042; 6: MY043; 7: MY044; 8: MY045; 9: MY046; 10: MY047。

表 2 不同治疗阶段的结核分支杆菌 VNTR 基因群分布

阶段	Ⅲ	V	其他群	合计	χ^2	P
初治	25	26	8	59		
复治	12	7	1	20	2.246	0.325
合计	37	33	9	79		

2.4 基因型与耐药的关系 79 株临床分离结核菌株的药敏结果显示,敏感菌株 62 株,耐药菌株 17 株,耐药率为 21.52%。单耐药菌株 7 株,多耐药菌株 10 株。耐药菌株集中分布于基因Ⅲ群和 V 群, V 群中 1/3 多的菌株表现耐药,耐药率高达 36.36%,明显高于Ⅲ群和其他群,两组差异有统计学意义,见表 3。

表 3 耐药菌株的 VNTR 基因群分布

项目	Ⅲ	V	其他群	合计	χ^2	P
耐药	4	12	1	17		
敏感	33	22	8	62	6.970	0.031
合计	37	33	9	79		
耐药率(%)	10.81	36.36	11.11			

3 讨论

结核分支杆菌基因分型技术对结核病流行病学调查、结核病监测、传染源发现、传播途径、发病机制、耐药机制以及病原进化的研究均有非常重要的意义^[8]。

MLVA 分型技术利用不同的 VNTR-MIRU 位点进行组合,包括 ETR(exact tandem repeats)位点、MIRUs(mutiple interspersed repetitive units)位点、QUBs(for Queen's University of Belfast)和 Mtubs 位点^[5]。由于各位点重复序列拷贝数在不同地区、同一地区不同临床分离的结核分支杆菌菌株中存在多态性,国内外学者都致力于研究适合本地区的 VNTR 位点组合^[2-6]。2006 年 Supply 等^[5]提出了 MLVA 分型标准化的建议,给出了分辨率与金标准 IS6110-RFLP 方法接近的 15 位点(用于分子流行病学研究)组合和 24 位点组合(用于系统发育学研究)的分型方案。虽然国内多地都相继对本地区结核分支杆菌进行了基因分型的研究,但鲜有采用 Supply 推荐的 15 位点组合的报道。

本研究采用 Supply 推荐的 15 个位点对绵阳地区的结核分支杆菌进行分子流行病学调查,结果显示各个位点的分辨率不同,QUB-11b 多态性最高,HGI 高达 0.880,ETR-C 多态性最低,HGI 也达到 0.234,各位点的 HGI 略高于国内相关文献报道^[4,9]。对 79 株结核分支杆菌进行聚类分析,共分为 7 个基因群,79 个独特基因型,初步证实绵阳地区分支杆菌具有明显的基因多态性,所选 15 个位点分型效果较为理想,具有较强的基因分型能力,15 位点组合适合绵阳地区结核分支杆菌的多态性研究。基因群以Ⅲ群(46.8%)和 V 群(41.8%)为主,为绵阳地区结核分支杆菌主要流行型,这表明绵阳地区结核病的防控应主要以这两群为主。其它菌株呈散在分布,无流行优势,考虑个别独立株由于内源性复燃引起^[10]。

不同来源的监测数据和研究结果显示,中国部分地区已成为全球耐药结核病的高流行区,耐药结核菌株的传播和流行已引起广泛重视^[11]。本研究对绵阳地区结核分支杆菌进行了耐药性检测分析,结果显示该地区耐药结核分支杆菌在临床分离菌株中占有一定比例(21.52%),低于全省 2010 年第五次结核病流行病学调查结果(29.6%)^[12],提示绵阳近年在结核病尤其在耐药结核的预防和控制中取得了显著成绩。结合基因分型结果,本研究发现 V 群中菌株耐药率高达 36.36%,显著高于Ⅲ群(10.81%)和其他群(11.11%),这表明绵阳地区结核分支杆菌的耐药性主要以 V 群菌株为主,研究结果对指导本地耐药结核病的防控具有重要意义。研究同时发现Ⅲ群、V 群和其他群菌株在绵阳地区分布没有地域差异,复治患者在Ⅲ群中的比例(32.43%)高于 V 群(21.21%)和其他群(11.11%),是否意味着复治患者与Ⅲ群菌株有着密切关系还有待进一步的研究证实。

致谢:本项研究数据分析工作得到中国疾病预防控制中心传染病预防控制所吕冰老师的大力支持,特此感谢!

参考文献:

- [1] Alves SL, Metzker FS, de Araújo-Filho JA, et al. Clinical data and molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from drug-resistant tuberculosis patients in Goiás, Brazil[J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011, 106(6): 655-661.
- [2] Dickman KR, Nabyonga L, Kateete DP, et al. Detection of multiple strains of Mycobacterium tuberculosis using MIRU-VNTR in patients with pulmonary tuberculosis in Kampala, Uganda[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10(349): 1-8.
- [3] Noguti EN, Leite CQ, Malaspina AC, et al. Genotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates from a low-endemic setting in northwestern state of Paraná in Southern Brazil [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2010, 105(6): 779-785.
- [4] 李兆娜, 刘梅, 吕冰, 等. 不同串联重复序列位点组合用于中国结核分支杆菌基因分型的能力比较分析[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(3): 215-222.
- [5] 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]. J Clin Microbiol, 2006, 44(12): 4498-4510.

图高信号或等信号提示病灶为血管源性水肿,但也要考虑 T2 透过效应的影响^[6]。本组有 1 例局部病灶 DWI 呈高信号,ADC 图是低信号,为细胞毒性水肿,随访证实该处病灶恢复正常,可能与治疗及时有关。如果治疗不及时或不得当,PRES 的可逆性病变也可转变为不可逆性脑梗死^[7]。有文献提出应用 DWI、ADC 图可以判断白质是血管源性水肿还是细胞毒性的,从而判断病变的可逆性,并指导临床积极、有效的治疗。

文献报道 PRES 除典型的影像学表现外,还有一些不典型的表现,可以发生在额颞叶、基底节区、小脑、桥脑、延髓、胼胝体压部等部位^[8-10],可以和顶枕叶同时发生,部分部位可以单独发生,其病灶的 CT、MRI 表现与顶枕叶表现一致,经积极抗血压等有效治疗预后良好、也有些学者认为脑干累及提示病情严重预后不佳。PRES 可合并脑梗死、脑出血等改变,提示病情预后不良。本组 3 例累及两侧额叶、1 例累及右侧额叶,由于与顶枕叶病灶同时发生,容易诊断。认识不典型的表现,对于 PRES 的早期正确诊断和治疗具有重要意义。

3.4 鉴别诊断 PRES 需与感染性病变、静脉窦血栓形成、脱髓鞘性疾病、缺血缺氧性脑病等病变鉴别^[11-12]。感染性病变一般呈不对称性发病,其中病毒性可对称,往往为颞、额叶大片状异常信号,增强扫描可出现多种强化表现,脑脊液检查对诊断有较大帮助。脑静脉或脑静脉窦血栓形成多表现为双侧顶叶、枕叶、基底节、丘脑后部受累,CT、MRI 检查可发现脑静脉或静脉窦内有血栓征象,可资鉴别。对脱髓鞘性疾病,如肾上腺白质营养不良,常累及顶枕部脑白质,平扫不易与 PRES 相鉴别,增强后病灶有“蝴蝶翼”样强化则易与 PRES 相鉴别。缺血缺氧性脑病可有多种明确病因(如煤气中毒、乙醇中毒、服药等),MRI 上病灶可于双侧顶、枕叶对称性分布,但在侧脑室周围及基底节区更多见,治疗后不可恢复。PRES 经治疗后大部分短期内 MRI 复查病变可明显缩小或完全恢复正常。

PRES 的影像学表现具有一定的特征性,除了对其典型特征了解外,还要了解其不典型表现,同时需要结合其临床表现、病因及用药情况,综合分析。早期诊断、治疗对 PRES 具有重要意义,否则造成不可逆性的神经功能缺失。

参考文献:

[1] Hinchey J,Chaves C,Appignani B,et al. A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome[J]. *N Engl J Med*,

1996,334(8):494-500.

- [2] 高波,吕翠,王学建,等.可复性后部脑病综合征的影像学诊断[J]. *中华神经医学杂志*,2005,4(10):1007-1010.
- [3] Lamy C,Oppenheim C,Méder JF,et al. Neuroimaging in posterior reversible encephalopathy syndrome[J]. *J Neuroimaging*,2004,14(2):89-96.
- [4] Sinha R,Hurley RM. Posterior reversible encephalopathy syndrome in SLE nephritis[J]. *Postgrad Med J*,2008,84(987):56.
- [5] 高波,王志业.可逆性后部脑病综合征发病机制及相关影像学研究进展[J]. *国际医学放射学杂志*,2011,34(1):12-14.
- [6] Covarrubias DJ,Leutmer PH,Campean NG. Posterior reversible encephalopathy syndrome: prognostic utility of quantitative diffusion weighted MR imaging[J]. *AJNR*,2002,23(6):1038-1048.
- [7] 王光彬,单瑞芹,赵斌,等.脑后部可逆性脑病综合征的 CT、MRI 诊断[J]. *中华放射学杂志*,2006,40(9):908-911.
- [8] 高波,岳凤斌,高伟,等.可逆性后部脑病综合征影像学分布模式的初步探讨[J]. *临床放射学杂志*,2009,28(3):306-309.
- [9] Kitaguchi H,Tomimoto H,Miki Y,et al. A brain stem variant of reversible posterior leukoencephalopathy syndrome[J]. *Neuro radiology*,2005,47(9):652-656.
- [10] Chen TY,Lee HJ,Wu TC,et al. MR imaging findings of medulla oblongata involvement in posterior reversible encephalopathy syndrome secondary to hypertension[J]. *Am J Neuroradiol*,2009,30(4):755-757.
- [11] 胡洁,赵红军,徐勋华,等.可逆性后部脑病综合征的影像学表现及诊断[J]. *临床放射学杂志*,2009,28(1):18-131.
- [12] 翁淑萍,李跃明,庞万良,等.可逆性后部脑病综合征的 CT 及 MRI 表现[J]. *中国医学影像技术*,2010,26(11):2037-2040.

(收稿日期:2011-09-06 修回日期:2012-02-16)

(上接第 2360 页)

- [6] 吕冰,李兆娜,刘梅,等.45 个可变数目串联重复序列位点用于中国结核分枝杆菌基因型鉴定的分辨力评价[J]. *中华流行病学杂志*,2009,30(1):58-62.
- [7] Hunter PR,Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems; an application of Simpson's index of diversity[J]. *J Clin Microbiol*,1988,26:2465-2466.
- [8] Matsumoto T,Iwamoto T. Future prospects of molecular epidemiology in tuberculosis[J]. *Kekkaku*,2009,84(12):783-784.
- [9] 李墨,焦伟伟,孙桂芝,等.不同 VNTR 位点组合用于北京基因型结核分枝杆菌基因分型的研究[J]. *中国人兽共*

患病学报,2008 年,24(6):505-509.

- [10] 石荔,范昕建,万康林.多位点可变串联重复序列技术用于西藏地区结核分枝杆菌基因分型的初步研究[J]. *中华流行病学杂志*,2007,28(5):477-481.
- [11] He GX,Wang HY,Borgdorff MW,et al. Multidrug-resistant tuberculosis, People's Republic of China, 2007-2009[J]. *Emerg Infect Dis*,2011,17(10):1831-1838.
- [12] 龙波,杨筠,李定越,等.四川省第五次结核病流调结核分枝杆菌耐药特性分析[J]. *预防医学情报杂志*,2011,27(10):822-824.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-01-06)