论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1408-03

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

王 均[1],黄延凤[2],张爱华[2],许红梅[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室[1],感染消化科[2])

【摘要】 **目的** 了解重庆地区儿童结核病中结核分枝杆菌临床分离株的数目可变串联重复序列(variable number tandem repeats, VNTR)的分布特征,寻找适合的VNTR位点组合。**方法** 采用多位点串联重复序列(multiple locus VNTR analysis, MLVA)分型方法,选择标化的24个VNTR位点,对101例结核分枝杆菌临床分离株DNA进行检测,结果采用BioNumerics 6.1数据库软件进行聚类分析和单位点Hunter-Gaston分辨率指数(Hunter-Gaston index, HGI)分析,并比较分析国际推荐的分组(12、15、24位点)的基因分型鉴定能力。**结果** MLVA分析结果显示24个VNTR位点在不同菌株中存在明显的多态性,101例结核分枝杆菌临床分离株可分为1个基因群83种基因型,其中69种基因型只有1个菌株,占68.32%(69/101),另有32株临床分离株表现出14种基因型,占31.68%(32/101),成簇率为17.82%;24个VNTR位点的HGI具有较大差异(0.168~0.829),HGI能达到0.5以上的VNTR位点数有16个;24个VNTR位点进行不同的位点组合:12、15个和24个位点组合的HGI分别为0.995、0.996、0.996。**结论** 重庆地区儿童结核病中结核分枝杆菌存在基因多态性,国际推荐的15个VNTR位点组合的MLVA分型方法适用于其流行病学的研究。

【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
【中图法分类号】 R372;R378.911;R394.3 【文献标志码】 A

Genotyping of 101 *Mycobacterium tuberculosis* isolates from pediatrics tuberculosis in Chongqing by multiple locus VNTR analysis

Wang Jun[1], Huang Yanfeng[2], Zhang Aihua[2], Xu Hongmei[2] ([1]Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood Cofounded by Chongqing and Ministry of Education, [2]Department of Infection and Digestion, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the distribution of the variable number tandem repeats (VNTR) in clinically isolated strains *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) from pediatrics tuberculosis in Chongqing and explore the effective loci combination of them by multiple locus VNTR analysis (MLVA). **Methods** Twenty-four standardized MLVA loci was used to type the 101 clinically isolated M. tuberculosis strains, and the results were analyzed by BioNumerics 6.1 software, which including dendrogram and Hunter-Gaston index (HGI) of 24 loci. The HGI of different loci set (12 loci, 15 loci, and 24 loci) was evaluated. **Results** Twenty-four loci showed different polymorphism. All the 101 clinical isolates were typed into one group that displaying 83 genotypes, in which 69 strains (68.32%, 69/101) were typed 69 genotypes respectively, and 32 strains (31.68%) were typed 14 genotypes which showed cluster rate of 17.82%. The HGI of 24 loci was from 0.168 to 0.829, the number of VNTR loci with HGI higher than 0.5 was 16. Three loci set displayed different polymorphism. HGI of 12 loci, 15 loci, and 24 loci set were 0.995, 0.996, and 0.996 respectively. **Conclusion** The clinical strains of *M. tuberculosis* isolated from pediatrics tuberculosis in Chongqing show definite polymorphism and the standardization 15 loci VNTR set of MLVA can be used in the molecular epidemiological study of these strains in Chongqing.

【**Key words**】 *Mycobacterium tuberculosis*; multiple locus variable number tandem repeats analysis; genotyping

Supported by the Project of Chongqing Scientific and Technological Planning (2008BB5389). Corresponding author: Xu Hongmei, E-mail: xuhongmei0095@sina.com

结核病目前仍是威胁人类健康的主要传染病之一,在我国其发病率及病死率均已居法定传染病第1位。对结核分枝杆菌进行基因分型研究是结核病现代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株的菌型,确定传染源及发现新的流行菌株,亦是研究主要流行株的基础。目前主要应用的基因分型

【基金项目】 重庆市科技计划项目(2008BB5389)
【通信作者】 许红梅,E-mail:xuhongmei0095@sina.com

方法有间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)方法、插入序列 6110 限制性片段长度多态性分型(IS6100-RFLP)、多位点串联重复序列基因分型(MLVA)等,而其中 MLVA 基因分型是目前应用较多且成熟的方法,其基本原理是对结核分枝杆菌基因组中存在的 VNTR 位点进行检测,通过计算各个 VNTR 位点的重复片段数目而将其分型[1]。与其他基因分型方法相比较,MLVA 基因分型具有操作简便,稳定性及重复性好,结果数字化有利于相互比较的优点。本研究应用该方法对重庆地区 101 例儿童结核病分离的结核分枝杆菌进行基因分型,以此探讨该地区儿童人群内结核分枝杆菌 MLVA 基因分型的分布特征,并探索适合该地区结核分枝杆菌 MLVA 基因分型的 VNTR 位点组合。

1 资料与方法

1.1 菌种来源

分离我院 2008 年 12 月至 2009 年 12 月收治的 101 例儿童肺结核患者的痰液、胃液或脑脊液培养标本。结核杆菌标准株 H37Rv 由重庆市结核病防治所提供,作为本次试验的阳性对照菌株。

1.2 主要试剂

结核分枝杆菌菌株保存液购自重庆博海达诚医疗器械有限公司,DNA 提取试剂盒购自大连普肽生物科技有限公司,2 × *Taq* PCR MasterMix、100 bp DNA Ladder Marker 购自天根生化科技有限公司,Besta™琼脂糖购自赛百盛基因技术有限公司。

1.3 结核分枝杆菌 DNA 的制备

将结核分枝杆菌临床分离株常规接种于 L-J 培养基,37 ℃培养 4 ~ 6 周,至菌落生长良好时,将菌落保存于结核分枝杆菌菌株保存液中 -70 ℃保存备用,同时取 200 μl 菌液沸水浴 30 min 灭活,根据 DNA 提取试剂盒操作说明提取 DNA -20 ℃保存备用。

1.4 MLVA 检测

1.4.1 引物设计及合成 采用 Supply 等推荐的 24 个 VNTR 位点[2],由上海鼎安生物科技有限公司合成。

1.4.2 反应体系和反应条件 采用 20 μl 反应体系,其中含上、下游引物各 2 μl (10 μmol/L),2 × *Taq* PCR MasterMix 10 μl,DNA 模版 2 μl (10 ng/μl),双蒸水 4 μl 补充至反应体积。PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 3 min;变性 94 ℃ 30 s,退火 62 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 1 min,30 个循环;终延伸 72 ℃ 7 min;4 ℃保存。

1.4.3 结果检测 取 6 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。之后,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。

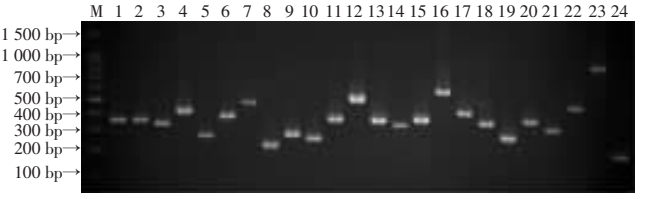
1.5 数据分析

将检测菌株呈现的 PCR 扩增条纹经 Gel-Pro analyzer4.0 软件数据化,以 100 bp 间隔的 DNA ladder 作标准,通过与 H37Rv 进行比较进一步确定每个菌株每个 VNTR 特异位点重复单元的重复次数[3],再用 BioNumerics (Version 6.1)数据库软件对菌株进行聚类分析,计算不同 VNTR 位点的 HGI[4],并分析比较国际推荐的 12 位点、15 位点、24 位点组合的综合 HGI。

2 结果

2.1 VNTR 多态性检测

本研究共选用了 24 个 VNTR 位点进行分析,结果显示位点之间存在多态性(图 1)。



M:标准;1 ~ 24:Mtub 04,Mtub 21,Mtub 29,Mtub 30,Mtub 34,Mtub 39,ETR A,ETR B,MIRU 02,MIRU 04,MIRU 10,MIRU 16,MIRU 20,MIRU 23,MIRU 24,MIRU 26,MIRU 27,MIRU 31,MIRU 39,MIRU 40,ETR C,QUB-11b,QUB-26,QUB-4156

图 1 1 株重庆地区儿童结核病结核分枝杆菌 VNTR 基因分型电泳结果

2.2 聚类分析

101 株结核分枝杆临床分离株根据 VNTR 重复次数,经过聚类分析后被分为 1 个基因群包含了 83 种基因型,均与标准菌株 H37R$_V$ 基因型不同,其中 69 种基因型只有 1 株临床分离株,占 68.32% (69/101),另有 32 株临床分离株表现出 14 种基因型,占 31.68% (32/101),成簇率[5]为 17.82%。

2.3 VNTR 位点的 HGI

不同 VNTR 位点的 HGI 具有较大的差异(表 1),为 0.168 ~ 0.829,能达到 0.5 以上的 VNTR 位点有 16 个。

表 1 本次研究所选 24 个 VNTR 位点的 HGI

序号	位点名称	重复次数		HGI
		H37Rv	本次实验	
1	MIRU 02	2	1 ~ 2	0.255
2	MIRU 04 (ETR D)	3	1 ~ 7	0.423
3	MIRU 10	3	2 ~ 8	0.689
4	MIRU 16	2	1 ~ 5	0.456
5	MIRU 20	2	1 ~ 3	0.168
6	MIRU 23	6	4 ~ 7	0.531
7	MIRU 24	1	1 ~ 2	0.444
8	MIRU 26	3	1 ~ 8	0.718
9	MIRU 27 (QUB-5)	3	1 ~ 4	0.445
10	MIRU 31 (ETR E)	3	2 ~ 6	0.636
11	MIRU 39	2	1 ~ 4	0.677
12	MIRU 40	1	1 ~ 4	0.617
13	Mtub 04	2	1 ~ 7	0.752
14	Mtub 21	2	1 ~ 8	0.815
15	Mtub 29	3	2 ~ 6	0.539
16	Mtub 30	1	2 ~ 4	0.573
17	Mtub 34	2	2 ~ 3	0.376
18	Mtub 39	2	1 ~ 6	0.795
19	ETR A	3	2 ~ 6	0.606
20	ETR B	3	1 ~ 3	0.464
21	ETR C	3	1 ~ 6	0.559
22	QUB-11b	5	1 ~ 9	0.829
23	QUB-26	5	1 ~ 11	0.749
24	QUB-4156	2	1 ~ 5	0.669

2.4 不同 VNTR 位点组合的 HGI

将24个VNTR位点组合为3组，为国际推荐的12位点、15位点和24位点组合（分别为1、2、3组）。第1组的综合HGI为0.995，能达到0.5以上的VNTR位点有5个，成簇率为15.84%，可将101株结核分枝杆菌分为83个基因类型，独特类型数为68个；第2组的综合HGI为0.996，能达到0.5以上的VNTR位点有13个，成簇率为17.82%，可将101株结核分枝杆菌分为83个基因类型，独特类型数为69个；第3组的综合HGI为0.996，能达到0.5以上的VNTR位点有16个，成簇率为17.82%，可将101株结核分枝杆菌分为83个基因类型，独特类型数为69个。

3 讨论

应用分子生物学方法对结核分枝杆菌进行基因分型，对于结核病的防治和监测具有重要的流行病学意义，对于儿童这一特殊群体更是如此，由于儿童（特别是婴幼儿）由于其活动范围的限制，其受到结核分枝杆菌的感染多来自家庭成员或频繁接触的人，故儿童结核分枝杆菌的流行情况间接反映了成人结核分枝杆菌的流行情况。

MLVA基因分型是建立在PCR技术之上的方法，由于其独特的数字式分型信息，能进行实验室之间的比较，现已建立了其专门的数据库供全球结核病流行病学的研究（http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces）[6-7]。国际上对目前结核分枝杆菌基因分型方法的研究普遍认为MLVA方法优于Spoligotyping方法，Spoligotyping分型目前应用较多为区分结核分枝杆菌的北京基因家族与非北京基因家族，但有研究报道MLVA中的Mtub02位点亦能区分该家族，且与Spoligotyping分型方法达到100%的相同[8]。IS6100-RFLP曾被视为结核分枝杆菌基因分型中的标准方法，但是该方法的应用受到诸多限制，如所需菌量大，操作时间长，技术繁琐，耗费高等缺点，不利于广泛推广应用；有研究显示15个VNTR位点的组合其检测分辨率很接近于标准方法IS6100-RFLP[2]，本次试验所选择的国际推荐的24个位点组合的MLVA基因分型方法的HGI为0.996，提示该分型方法对重庆地区儿童结核分枝杆菌有较高的分辨率。我们发现在101株结核分株杆菌中存在83种基因型，包含69种独特基因型和14种成簇基因型，说明重庆地区儿童结核分枝杆菌基因型有明显的多态性，但并没有发现在传播中占优势的菌群。而有研究[9]曾报道，通过12个位点的MLVA基因分型分析150例结核分枝杆菌发现重庆地区儿童中传播的优势菌群其基因型为223325173533，HGI为0.98。说明通过增加VNTR位点的数目，不仅提高了检测的分辨率，亦对主要的流行株进行了有效的辨析，这亦有利于监测本地区儿童中传播的优势菌群。

24个VNTR位点虽然有很高的检测分辨率，本实验显示其中只有16个位点的HGI高于0.5，剩余8个位点的特异性不强，而对于大样本量的结核分枝杆菌MLVA基因型分析，这些特异性不强的位点不仅加大工作量，还增加了研究的成本。进一步对3组国际推荐的不同VNTR位点组合进行了相互比较，发现15个位点的组合其HGI与24个位点的组合其HGI相同，因此，考虑到工作量及试验成本，以及在不影响实验结果的情况下，国际推荐的15个位点组合的MLVA基因分型方法适用于重庆地区儿童结核分枝杆菌。本实验并没有分析16个高HGI位点的分辨率，是因为自由组合位点的MLVA分型所得到的数字化分型信息并不利于在数据库中进行比较分析。

综上所述，重庆地区儿童结核病中结核分枝杆菌存在基因多态性，国际推荐的15个VNTR位点组合的MLVA分型方法适用于本地区儿童结核病中结核分枝杆菌流行病学的研究。

参考文献：

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

[2] 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.

[3] 查佳，高谦. MIRU-新的结核分枝杆菌基因型分型方法简介[J]. 中国防痨杂志，2005，27(3)：189-191.

[4] Hunter P R, Gaston M A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2465-2466.

[5] Small P M, Hopewell P C, Singh S P, *et al*. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods[J]. N Engl J Med, 1994, 330(24): 1703-1709.

[6] Allix-Beguec C, Harmsen D, Weniger T, *et al*. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2692-2699.

[7] Weniger T, Krawczyk J, Supply P, *et al*. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(Web Server issue): W326-W331.

[8] 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[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2007，27(8)：711-718.

[9] 彭哲，朱朝敏，李奇志，等. 儿童结核分枝杆菌临床分离株基因分型的初步研究及耐药相关性分析[J]. 中国实用儿科杂志，2010，25(8)：622-624.

（收稿：2010-12-05 修回：2011-01-11）

（编辑 邓强庭）