DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.032

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0942-03

随机扩增DNA指纹分型分析耐利福平结核分支杆菌的传播

陈 炜[1],钟 敏[2],温博海[1],陈 荣[1],钟 明[2],娄乐山[2],王安容[2],蹇 锐[1] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038;[2]重庆市肺科医院,重庆 400020)

提 要:目的 对临床分离菌株进行鉴定,分析耐利福平结核分支杆菌是否在人群中传播。**方法** 采用一对随机引物(P_1 5'-CCGGGGCGGTTC; P_2 5'-CCGCCGACCGAC),对从重庆地区肺结核病人痰标本中分离到的100株耐利福平结核分支杆菌的DNA进行随机PCR扩增,根据扩增产物的DNA电泳指纹进行分型。**结果** 100株耐利福平结核分枝杆菌的DNA指纹可分为6种类型,以Ⅱ、Ⅰ和Ⅲ型为主,它们分别占40%、31%和25%;这3型菌株有1/4是从初治结核病人的痰标本中分离,而在20~39岁年龄段则有1/3是从初治结核病人的痰标本中分离。**结论** 随机扩增DNA指纹是一种简便、敏感、重复性好的菌株分型方法,可用于耐药性结核病流行监测。重庆地区结核病的流行很可能与耐利福平结核分支杆菌的传播有关。

关键词:结核分支杆菌;利福平;耐药;DNA指纹

中图法分类号:R394.2;R446.9 **文献标识码**:A

Evidence of transmission of *M tuberculosis* resisting to rifampin by random amplified polymorphic DNA fingerprinting

CHEN Wei, ZHONG Min, WEN Bo-hai, CHEN Rong, ZHONG Ming, LOU Le-shang, WANG An-rong, JIAN Rui (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine whether *Mycobacterium tuberculosis* resisting to rifampin transmits among people. **Methods** The fingerprints of genomic DNA from *M tuberculosis* strains resisting to rifampin, isolated from sputum specimens of 100 pulmonary tuberculosis patients, were obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting with primer 1 (5'-CCGGGGCGGTTC) and primer 2 (5'-CCGCCGACCGAC). **Results** Six types of DNA fingerprints were classified; the main types were II, I and III and they were 40%, 31%, and 25%, respectively. Approximately 24% of type I, II, and III strains were isolated from the patients who had received inifial anti-tuberculosis treatment; approximately 31% of the 3 type strains were isolated from the first treated young patients (20~39 year old). **Conclusion** The RAPD fingerprinting is an useful method to type *M tuberculosis* strains; the prevalence of tuberculosis resisting to rifampin in Chongqing city may be primarily due to the transmission of type II, I and III strains.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; rifampin; drug resistance; DNA fingerprinting

我国的结核疫情十分严重,据1990年全国流行病学调查,我国结核病患病率为523/10万,死亡率19/10万;重庆市是结核病高发区,患病率和死亡率分别高达885/10万和30/10万,远高于全国平均水平。造成结核病死灰复燃,卷土重来的重要原因:一是AIDS等免疫缺陷患者的增多,二是多重耐药结核杆菌的出现和传播。结核杆菌多重耐药菌株是指对耐异烟肼和利福平两种或两种以上抗结核药物的结核分支杆菌[1]。

利福平(Rifampin)是抗结核一线药物,它在短程化疗中起着重要作用。结核分支杆菌一旦对利福平产生耐药,往往预示着多重耐药性的出现,将导致结核病疗程延长和预后不良。因此,耐利福平结核分支杆菌的出现和流行已引起特别的关注。目前,国内尚未见专门针对耐利福平结核分支杆菌传播的流行病学研究。我们采用随机扩增DNA指纹技术,对1998-09~2000-05间从重庆地区肺结核病人的痰标本中分离到100株耐利福平结核分支杆菌进行基因分型,探讨耐药结核病的流行是否是由于耐药菌株的传播,以便为该地区结核病的防治提供理论依据。

基金项目:重庆市医学重点资助项目(99-1002)和重庆市科委攻关资助项目(2000年)

作者简介:陈 炜(1977-),女,上海市人,助理实验师。电话:(023)68752239

收稿日期:2001-02-07;**修回日期**:2001-05-11

1 材料与方法

1.1 菌株来源

100株耐利福平结核杆菌株由重庆市肺科医院100例肺结核病人(病人主要来自该市的渝中区和江北区)的痰标本初次分离培养。菌株的培养、鉴定、耐药性测定均按《结核病诊断细菌学检验规程》[2]进行。

1.2 DNA的制备

从斜面上挑取结核分支杆菌单个菌落于生理盐水中混匀,将该菌液离心沉淀后溶于540 μl TE(10 mmol/L Tris·HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)中,并加入30 μl 10% SDS,5 μl蛋白酶K(20 mg/ml),25 μl溶菌酶(50 mg/ml)混匀。37 ℃孵育1 h后加入100 μl NaCl(5 mol/L),再加入80 μl CTAB/NaCl(10% CTAB/0.7 mol/L NaCl),65 ℃保温10 min。加入等体积氯仿:异戊醇(24:1)混匀,离心5 min;将上清用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)混合,离心5 min。再将上清加0.6倍体积异丙醇离心10 min;沉

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

淀物用 70% 乙醇洗涤一次，将沉淀悬于 20 μl TE 中。在进行 RAPD 时，为保证各株间 DNA 的起始量基本恒定，DNA 模板的浓度为(20 ± 5) μg/ml。

1.3　PCR 扩增

随机引物为 P_1 5'-CCGGGGCGGTTC 和 P_2 5'-CCGCC-GACCGAC[3] 由上海生工生物工程公司合成，PCR 试剂均向该公司购买。PCR 扩增采用 25 μl 反应体系，0.5 ml 反应管中加入 2 μl DNA 模板，2.5 μl PCR 缓冲液(10×)和 17 μl ddH_2O；反应混合物中含 3.6 μmol/L 引物，0.2 mmol/L dNTP，2.5 U Taq 酶。在 DNA 扩增仪内 94 ℃作用 3 min 后，以 94 ℃ 30 s，40 ℃ 15 s 和 72 ℃ 30 s 循环 35 次。

1.4　聚丙酰胺凝胶电泳[4]

在 Mini-PROTEAN Ⅲ型(美国，BIO-RAD)电泳槽上用 30% 丙烯酰胺溶液(含 294 g/L 丙烯酰胺和 6 g/L 甲叉双丙烯酰胺)制备 6% 的 70 mm × 80 mm × 0.75 mm 非变性凝胶，每孔加入 5 μl PCR 产物，用 TBE 电泳液在 100 V 电压下电泳 1 h。

1.5　硝酸银染色

电泳完后用 10% 的冰醋酸将凝胶固定 30 min，用水漂洗 3 次；用 100 ml 硝酸银液(含 0.1 g 硝酸银，15 μl 37% 甲醛)染色 30 min，漂洗 3 次；用 100 ml 显色液(含 3 g 碳酸钠，0.04 mg 硫代硫酸钠，50 μl 37% 的甲醛)显色，待 DNA 指纹出现后用 10% 的冰醋酸终止反应。

2　结果

2.1　PCR 扩增

采用随机引物扩增了 100 株耐利福平结核分支杆菌 DNA，均获得了阳性扩增产物；PCR 产物经聚丙酰胺凝胶电泳和硝酸银染色显示 DNA 指纹，扩增的 DNA 片段在 100 ~ 4 000 bp，带型清晰，见图 1。

2.2　DNA 指纹重复性实验

从 100 株 DNA 样本中随机抽取 6 份进行实验，样本的 DNA 的浓度最高为 23.2 μg/ml，最低为 20.1 μg/ml，每份样本均重复扩增 3 次，3 次所获得的 DNA 指纹相同。同时，对起始 DNA 的浓度进行 2 倍、4 倍稀释后进行扩增，所获得的指纹也相同。

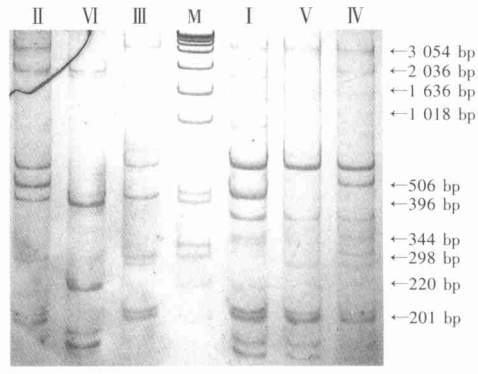


图 1　耐利福平结核分支杆菌的 6 种随机扩增 DNA 指纹

Fig 1　Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of 6 types of *M. tuberculosis* strains resisting to rifampin

2.3　随机扩增 DNA 指纹分型

100 株耐利福平结核分支杆菌的随机 DNA 扩增产物所产生的指纹可归纳为 6 种指纹类型，见图 1。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ型的指纹均在 ~ 4 072 bp 和 ~ 720 bp 位置上各有一条带，在 ~ 200 bp 有两条带；Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ在 ~ 480 bp 有一条带，而Ⅰ、Ⅳ和Ⅴ则在 350 ~ 400 bp 之间有一条带；Ⅵ型的更独特，仅在 ~ 2 000 bp 与Ⅱ和Ⅳ型有同位带。Ⅱ、Ⅰ和Ⅲ型分别占总数的 40%、31% 和 25%。而Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ分别为 1% ~ 2%。

3 种主要指纹类型菌株与病人年龄和耐药类型的关系分别见表 1、2。

表 1　3 种主要指纹类型在不同年龄组中的分布

Tab 1　Distribution of three main types of DNA fingerprinting in various age groups

Age (years)	Type Ⅰ (IT, %)	Type Ⅱ (IT, %)	Type Ⅲ (IT, %)	Total (IT, %)
20 ~ 39	17(4, 24)	27(7, 26)	13(6, 46)	57(17, 31)
40 ~ 59	10(1,10)	8(0,0)	5(1,20)	23(2,9)
60 ~ 79	4(2,50)	5(1,20)	7(3,43)	16(6,38)
Total (IT, %)	31(7, 23)	40(8, 20)	25(10, 40)	96(25, 26)

IT: Cases of initial treatment

表 2　3 种主要指纹类型菌株的耐药类型

Tab 2　Type of drug resistance in the main DNA fingerprinting types

Type	Resistance to RIF		Resistance to RIF and INH[a]		Resistance to RIF and other drugs[b]		Total	
	IT(%[c])	RT(%)	IT(%)	RT(%)	IT(%)	RT(%)	IT	RT
Ⅰ	1(14)	0(0)	4(57)	17(71)	2(29)	7(29)	7	24
Ⅱ	0(0)	3(9)	6(75)	14(44)	2(25)	15(47)	8	32
Ⅲ	0(0)	0(0)	9(90)	5(33)	1(10)	10(67)	10	15
Total(%)	1(4)	3(4)	19(76)	26(37)	5(20)	22(31)	25	71

RIF: Rifampin; INH: Isoniazid; IT: Initial treatment; RT: Re-treatment; a: At least resist to rifampin and isoniazid; b: Besides rifampin and isoniazid, resist to one of the anti-tuberculosis drugs (streptomycin, ethambutol, pamisyl, tasiniazide, capromycin, kanamycin, T1321, ofloxacin); c: Percentage of total cases (initial treatent/re-treatment)

3　讨论

耐利福平结核分支杆菌的分型是对耐药结核病的流行进行监测的重要手段，对耐药结核病的防治具有重要意义。目前对结核分支杆菌菌株进行分型采用 IS6110 探针、脉冲场凝胶电泳(Pulsed-field gel electrophoresis，PFGE)以及随机扩增 DNA(RAPD)指纹分析等分子生物学技术。IS6110 探针和 PFGE 分析均需要较多的 DNA 样本和较复杂的技术，往往需要耗时数天，而 IS6110 探针分析还需要用增强化学发光物标记探针[5]。RAPD 是在 PCR 技术基础上发展起来的一种新的基因分型法，是利用随机引物与细菌基因组多个部位的结合，在 DNA 扩增仪中产生不同分子量 DNA 片段。片段的大小和数量的差异与细菌菌株基因组的多样性而导致引物结合部位、数量不同有关。该次研究将简便的随机引物 PCR 扩增和分辨率高的 DNA 聚丙

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

烯凝胶电泳,以及敏感的DNA银染技术相结合建立的RAPD指纹分析仅需约5~6 h便能完成,且所用样本量少,敏感性和重复性均好,可有效的对结核分支杆菌分型。

该研究用RAPD指纹分析了近2年来从重庆市主城区肺结核病人中分离到的100株耐利福平结核分支杆菌,依据所获得的DNA指纹可将它们归纳为六种类型,其中Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型占绝大多数。另外,从表1中可以发现约1/4以上的病人是初次进行抗结核治疗时分离到耐利福平结核分支杆菌;在耐利福平病人中有大部分为20~39岁中青年,而他们中有1/3是在初次进行治疗时分离到耐利福平结核分支杆菌。这些分析结果证明该地区的耐利福平结核病人的出现不一定是由于利福平的长期使用所致(获得性耐药),而更可能是由于原发的耐利福平菌株的感染(原发性耐药),并提示Ⅱ、Ⅰ和Ⅲ型耐利福平结核分支杆菌正在该地区的人群中传播。

Ⅱ、Ⅰ和Ⅲ型耐利福平菌株的大多数除耐利福平外,还耐其他抗结核药物,特别是第一线药物异烟肼;在初治的病人中分离到耐利福平菌株中有96%同时耐其他抗结核药物,同时耐异烟肼的为76%。耐利福平和异烟肼两种以上抗结核药物菌株所引起的结核病称之为耐多药结核病。通常耐多药结核病发生在经WHO或其他复治方案治疗失败后的慢性病人中,但是这次从初治病人中所分离到的耐利福平菌株绝大多数为耐多药菌,说明耐多药结核分支杆菌正在该地区传播。

以上分析结果证明重庆地区耐利福平结核病的流行与耐多药结核分支杆菌的传播密切有关,因此有效地控制耐多药结核分支杆菌的传播是目前控制该地区结核病的蔓延的关键。

参考文献:

[1] 屠德华.耐药性结核病的流行病学特征和意义[J].中华结核和呼吸杂志,1997,20(6):327-328.
[2] 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996,18(1):28-31.
[3] Palittapongarnpim P, Chomyc S, Fanning A, *et al*. DNA fragment length polymorphism analysis of Mycobactrium tuberculosis isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction[J]. J Infect Dis, 1993, 167(4):975-978.
[4] 萨姆布鲁克J,弗里奇E F,曼尼阿蒂斯T.分子克隆实验指南[M].金冬雁,黎孟枫,张德政,等译.第2版.北京:科学出版社,1998.325-330.
[5] 李传友,马 玮,邢爱英,等.DNA指纹技术方法学的建立及在结核分枝杆菌菌株鉴定中的应用[J].中华结核和呼吸杂志,1999,22(3):142-144.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2001)08-0944-02

我院1年中麻疹临床特点分析及对策

Epidemic features and countermeasures of measles in Chongqing Medical University Children's Hospital during 1999-2000

周亚玲,苟元珍,易成珍 (重庆医科大学儿童医院,重庆 400014)

麻疹是我国计划消灭的传染病。自从1965年开展免疫接种以来,麻疹的发病率逐年下降。然而,近1年来我院麻疹病人大幅度上升。现将1999-09-2000-08来我院就诊的336例麻疹病人进行回顾性总结分析,探讨其流行特点,为制定预防麻疹措施提供科学依据。

1 资料

1.1 流行病学资料

1.1.1 我院1999-09-2000-08收治麻疹病人336例;门诊132例,住院204例。男196例,女140例。年龄最小2月,最大14岁,见表1。患儿时间分布见表2。

204例住院病人中,来自农村占55.88%(114/204),有预防接种史占22.5%(46/204),无接种史63.7%(130/204),不清楚是否接种13.7%(28/204),有明确麻疹接触史22.5%(46/204),无接触史占2.94%(6/204),不清楚有否接触史为74.5%(152/204)。

表1 336例麻疹患儿年龄分布

年龄(岁)	0~1	2~3	4~5	6~8	9~10	11~12	>12	合计
例数	114	64	64	63	20	7	4	336
%	33.9	19.0	19.0	18.8	5.9	0.21	0.12	100.00

表2 336例麻疹患儿时间分布

	1999年				2000年								合计
	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	
例数	2	2	8	9	7	14	40	67	85	46	26	30	336
%	0.006	0.006	2.4	2.7	2.1	4.2	11.9	19.9	25.3	13.7	7.7	8.9	100.0

作者简介:周亚玲(1963-),女,四川省广安县人,主治医师,主要从事医院感染方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)63622824
收稿日期:2001-01-15;修回日期:2001-04-12

(下转947页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net