

陕西省 87 株耐药结核分枝杆菌寡核苷酸基因分型和耐药性分析

李妍¹, 曾小红², 杨健¹, 王蕊¹, 鲜小萍¹, 张天华¹

1. 陕西省结核病防治研究所 陕西 西安 710048; 2. 厦门大学生命科学学院 福建 厦门 361102

摘要: 目的 对陕西 87 例耐药结核分枝杆菌进行分型研究, 了解不同基因型在陕西的流行情况及耐药相关性。方法 收集陕西省结核分枝杆菌耐药菌株 87 株, 采用 Spoligotyping 方法对结核分枝杆菌临床分离株进行基因分型。结果 87 株耐药结核分枝杆菌中北京家族占 86.21% (75/87), 非北京家族占 13.79% (12/87); 非北京基因型中, T 家族 (T1、T2、T2-3、T3) 占 9.20% (8/87), Manu 家族占 1.15% (1/87), 新发现基因型占 3.45% (3/87)。北京家族和非北京家族的单耐药、多耐药、耐多药、其他类型耐药比率分别为 38.67% (29/75)、13.33% (10/75)、42.67% (32/75)、5.33% (4/75) 和 66.67% (6/9)、11.11% (1/9)、22.22% (2/9)、0.00% (0/3), 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 陕西省结核分枝杆菌呈基因多态性, 其主要流行基因型为北京家族; 北京家族和非北京家族的耐药性差异无统计学意义。

关键词: 结核分枝杆菌; 间隔区寡核苷酸分型; 北京家族; 耐药

中图分类号: R115 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2018)09-1679-05

Spoligotyping genotyping and drug resistance of 87 Mycobacterium tuberculosis strains Shanxi

LI Yan*, ZENG Xiao-hong, YANG Jian, WANG Rui, XIAN Xiao-ping, ZHANG Tian-hua

* Shaanxi Provincial Institute for TB Control and Prevention, Xi'an, Shanxi 710048, China

Abstract: Objective To understand the prevalence of different genotypes and drug resistance through 87 clinically isolated drug-resistant Mycobacterium tuberculosis (MTB) strains in Shanxi. **Methods** 89 clinically isolated drug-resistant MTB isolates were collected, whose genotypes were analyzed with Spoligotyping. **Results** 87 clinically isolated Mycobacterium tuberculosis strains mainly belonged to Beijing family (86.21% 75/87) and the proportion of non-Beijing family was 13.79% (12/87). Among the non-Beijing family, 8 isolates were part of T family (9.20% 8/87), including T1, T2, T2-3, T3 family and 1 isolate was from the Manu family (1.15% 1/87). Additionally 3 (3.45% 3/87) isolations were new-found. The rates of MR-TB, PDR-TB, MDR-TB and other types of drug resistance in Beijing family and non-Beijing family were 38.67% (29/75) vs 13.33% (10/75), 42.67% (32/75) vs 5.33% (4/75) and 66.7% (6/9) vs 11.11% (1/9), 22.22% (2/9) vs 0.00% (0/3), respectively. All the resistance rates were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Mycobacterium tuberculosis in Shanxi has genetic polymorphism and the main genotype is the Beijing family. There was no significant difference in the drug resistance between the Beijing family and non-Beijing family.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis; Spoligotyping; Beijing family; Drug resistance

据 WHO 估计, 2015 年全球新发结核病人 104 万例, 耐多药结核病人 48 万例。我国仍是耐药肺结核的高负担国家之一^[1]。基因分型技术可以检测出结核分枝杆菌的基因类型, 发现传播规律, 有效控制结核病的爆发流行^[2]。间隔区寡核苷酸分型 (Spoligotyping) 技术是建立在 PCR 基础上, 检测结核分枝杆菌 DNA 的直接重复区 (DR) 多态性的基因分

型方法^[3], 具有快速、可靠、稳定性高等特点。基于不同结核分枝杆菌菌株 Spoligotyping 结果的异同, 可以快速区分北京基因型菌株及其他家族菌株^[4]。大量研究结果表明, 北京基因型菌株已成为我国, 乃至日本、东南亚、俄罗斯等国家和地区的主要流行菌株^[5-6]。也有文献报道, 北京家族基因可能具有较强的传播能力, 并可能与耐药性结核病存在关联, 但结果不尽相同^[7-8]。本文对在陕西省收集的 87 株耐药结核分枝杆菌临床菌株进行了 Spoligotyping 分型, 以了解该地区耐药结核分枝杆菌的基因型特征及主要流行菌株的情况, 分析不同基因型与耐药性的关系,

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目 (No. 2016SF-272)

作者简介: 李妍 (1981-), 女, 硕士, 检验科主任, 副主任医师, 研究方向: 结核病实验室诊断

为该地区的耐药结核病防治工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 本研究所用菌株均来自 2016 年 1 月 - 12 月陕西省结核病防治研究所收集的来自全省不同地区的耐药菌株,并鉴定为结核分枝杆菌复合群。结核分枝杆菌标准株 H37Rv 由中国疾控中心国家结核病参比实验室惠赠。

1.2 仪器与试剂 ZEESAN SLAN 96 荧光 PCR 仪、Lab - Aid824 核酸提取仪、结核分枝杆菌 McSpoligotyping 分型检测试剂盒(荧光 PCR 熔解曲线法,批号 17080801)及 Lab - Aid824 结核分枝杆菌核酸提取 Maxi 试剂(批号 170705)购于厦门致善生物科技股份有限公司;分枝杆菌药敏及菌种鉴定培养基均购自珠海贝索生物技术有限公司(批号 20170329)。

1.3 药敏试验及菌型鉴定方法 采用比例法,参照《分枝杆菌药物敏感性测定标准化操作程序》^[9],所用 6 种药物分别是链霉素(SM)、异烟肼(INH)、利福平(RFP)、乙胺丁醇(EMB)、卡那霉素(KM)、氧氟沙星(OFX),终浓度分别为:4.0 μ g/ml,0.2 μ g/ml,40.0 μ g/ml,2.0 μ g/ml,30.0 μ g/ml,2.0 μ g/ml。菌种鉴定与药敏试验同时进行^[9],鉴别培养基为对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)。

1.4 DNA 提取 采用磁珠法,所有菌株经过传代,用标准接种环(22SWG)挑取半环生长良好的结核分枝杆菌菌落重悬于 200 μ l DNA 提取液中,涡旋震荡,99 $^{\circ}$ C 灭活 20min。按照 Lab - Aid824 结核分枝杆菌核酸提取仪操作流程,仪器自动提取。程序运行完成后,收集上清即为后续基因分型过程中的模板 DNA,放置 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.5 Spoligotyping 采用探针熔解曲线分析方法,严格按照厦门致善生物技术有限公司结核分枝杆菌 McSpoligotyping 分型检测试剂盒说明书,PCR 体系配制标准为 19.75 μ l McSpoligotyping PCR Mix(A/B/C)和 0.25 μ l McSpoligotyping 酶混合液,加入 5 μ l DNA 模板,放入 ZEESAN SLAN 96 荧光 PCR 仪进行扩增和熔解分析。PCR 反应程序为 50 $^{\circ}$ C 5min,1 个循环,95 $^{\circ}$ C 10min,1 个循环,95 $^{\circ}$ C 15s,57 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 15s,50 个循环,设置 57 $^{\circ}$ C 退火阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 CY5 通道荧光信号。熔解曲线分析程序为 95 $^{\circ}$ C 1min,35 $^{\circ}$ C 1min,1 个循环,设置 35 $^{\circ}$ C ~ 90 $^{\circ}$ C 采集 FAM、HEX、ROX 和 CY5 通道荧光信号。

1.6 结果判读 43 个间隔子由 43 条能够与之特异

杂交的荧光探针检测,分别有对应的荧光标记与熔点温度(T_m)。实验运行结束后,分析软件自动读取每个样本的 43 个间隔子的荧光与 T_m ,若对应的熔点范围内有熔解峰,则该间隔子存在,表示为“n”;若无熔解峰,则该间隔子缺失,表示为“0”;最后的结果按间隔子 Sp1 至 Sp43 的顺序,自动给出一个对应的 43 位二进制码。

1.7 质量控制 每批次均使用试剂盒配套的阳性和阴性对照品做质控。同时采用结核分枝杆菌标准菌株 H₃₇RV 作为质控菌株。

1.8 统计分析 将所有菌株的 McSpoligotyping 基因分型数据即 43 位二进制码 n 和 o 分别转换为 1 和 0 的格式(1 表明间隔区存在,0 表明间隔区缺失)录入 Excel 表。将基因分型数据提交至国际数据库 http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE/query,将得到的分型结果与数据库 Spol DB 4.0^[10]进行比对,确定菌株的 spoligotyping 国际型别(SIT)号和所属的基因家族。再将 McSpoligotyping 基因分型数据提交至国际数据库 MIRU - VNTRplus (<http://www.miru-vnrplus.org/MIRU/index.faces>)进行聚类分析。采用 SPSS 18.0 软件进行分析,耐药率之间差异的比较可采用 χ^2 检验或校正 χ^2 检验。若 $P < 0.05$,为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 耐药情况 87 株耐药菌株中,单耐药 36 株,占 41.38% (36/87);多耐药 11 株,占 12.64% (11/87);耐多药 36 株,占 41.38% (36/87);其他形式的有 4 株,占 4.60% (4/87)。

2.2 87 株耐药结核分枝杆菌基因型分布 87 株耐药结核分枝杆菌经 McSpoligotyping 法分型,分为北京基因型和非北京基因型两大类,其中北京基因型菌株为 75 株,占 86.21% (75/87),非北京基因型菌株 12 株,占 13.79% (12/87),包括 T 家族(T1、T2、T2-3、T3) 8 株,占 9.20% (8/87);Manu 家族 1 株,占 1.15% (1/87),新发现基因型 3 株,占 3.45% (3/87)。将获得的寡核苷酸基因分型数据与 Spol DB 4.0 数据库比对后,得到每个菌株的 spoligotyping 国际型别编码(SIT)及所属基因家族,一共得到 14 种不同的基因型,其中 12 种型别有对应的 SIT 编号,其余 3 株分为 2 种型别在 SPOIDB4.0 数据库中无匹配结果,为新发现基因型。见图 1、表 1。

为 42. 67% (32/75) 、22. 22% (2/9) ;其他耐药类型比率分别为 5. 33% (4/75) 、0. 00 (0/3) ,差异均无统计

学意义($P > 0. 05$)。见表 2。

表 2 北京基因型菌株与耐药种类的相关性分析

耐药种类	北京型菌株(%)	非北京型菌株(%)	新发现(%)	χ^2 值	P 值
单耐药	29(38. 67)	6(66. 67)	1(33. 33)	1. 57 ^a	>0. 05
多耐药	10(13. 33)	1(11. 11)	0(0. 00)	0. 11 ^a	>0. 05
耐多药	32(42. 67)	2(22. 22)	2(66. 67)	0. 67 ^a	>0. 05
其他	4(5. 33)	0(0. 00)	0(0. 00)	0. 01 ^a	>0. 05
合计	75	9	3		

注: ^a 表示采用校正 χ^2 。

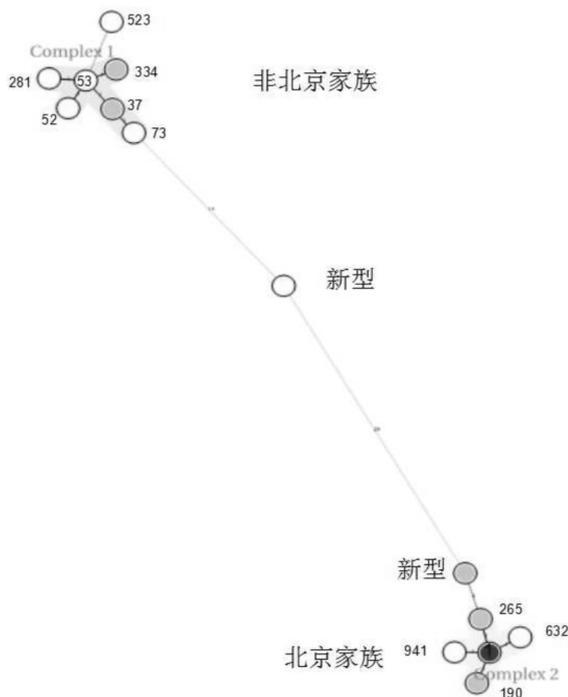


图 2 87 株耐药结核分枝杆菌聚类分析图

注: 红色代表该基因型存在的菌株数量较多;紫色代表该基因型有 2 株菌;白色代表该基因型有 1 株菌;实线上的数字表示不同基因型之间有多少个间隔区存在差异

3 讨论

目前,结核分枝杆菌基因分型技术使用最广泛的有间隔区寡核苷酸分型(Spoligotyping)和多位点可变数量串联重复序列分析(MLVA)。Spoligotyping 通过 PCR 扩增 DNA 间隔区,与固定有间隔区寡核苷酸探针的 Biodye C 膜进行杂交,来检测已知序列的 43 个间隔区的 DR 区的存在或缺失,结果以 43 位二进制码表示(其中“1”表示间隔区存在,“0”表示间隔区缺失)。传统的膜杂交 Spoligotyping 需要制备膜、DNA 扩增、膜杂交、膜清洗、显影及根据显影条带有无黑点转换成数字等步骤耗时长、操作也比较繁琐^[11]。本

实验采用厦门致善生物科技股份有限公司的 McSpoligotyping 分型检测试剂盒(探针熔解曲线法),PCR 体系配好后,仅需一步加样操作,即可在 ZEESAN SLAN 96 荧光 PCR 仪上完成 PCR 扩增与熔解反应,分型结果由软件自动读取并以 43 位二进制码输出(其中“n”表示间隔区存在,“o”表示间隔区缺失)。与膜杂交法相比,该方法操作简单、快速、自动化程度高,且每次可同时检测 30 例样本,通过 Tm 值判读明确,因此具有明显的优势。

由于北京基因型菌株具有特定的 Spoligotyping 图谱,表现为典型的北京家族基因型前 1~34 DR 间隔区缺失,仅有后 9 个 DR 间隔区即 35~43 存在;不典型的北京基因型 1~34 DR 间隔区也缺失,而后 9 个 DR 间隔区中有个别间隔区缺失,因此利用该方法可以对北京家族菌株进行鉴定^[11]。本研究通过对陕西省耐药结核分枝杆菌菌株进行 Spoligotyping 基因分型检测,结果显示,陕西省的北京基因型菌株占全部菌株的 86. 21% (75/87),主要流行簇为 SIT1,为陕西省主要流行基因型与赵秀芹^[12]报道的(80. 00%)接近。和其他省份相比,高于厦门^[13]、云南^[14]等南方地区,与河南^[11]、安徽^[7]等地区相似,表明北京基因型是我国的主要流行基因型,但分布存在明显的地域性差异,南方地区北京基因型菌株所占比例低于北方地区。研究显示,本地区北京家族基因型可分为 5 种基因亚型,而非北京家族包含 T 家族(T1、T2、T3)、Manu 家族表现出较高多态性。新发现基因型仍有待进一步研究。

本研究将 87 株耐药结核分枝杆菌基因类型的不同进行分类,结果显示,北京基因型菌株的单耐药率、多耐药率、耐多药率、其他类型比率均高于非北京基因型,但差异均无统计学意义($P > 0. 05$),与刘志广报道^[15]的西安地区的结果相似,均表明结核分枝杆菌北京家族与耐药性之间没有明显的相关性,原因可能与本研究的样本量较少有关,笔者今后会扩大样本

量对此方面做进一步研究。由于本实验样本量较少,未能将年龄、性别等其他信息进行统计分析,在今后的研究中会予以补充。

综上所述,本研究对陕西省耐药结核分枝杆菌进行基因分型和主要流行菌株进行研究,了解到陕西省是以北京家族基因型为主的优势菌,流行株是国际数据库 SIT1 基因型,提示我们在结核病的分子流行病学监测中应以该类型的基因家族为重点,采取措施,对陕西地区耐药结核病流行的预防和控制具有重要意义。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [R]. Geneva: World Health Organization 2016.
- [2] Grandjean L, Gilman RH, Martin L, et al. Transmission of Multidrug - Resistant and Drug - Susceptible tuberculosis within households: a prospective cohort study [J]. PLOS Medicine, 2015, 12 (6): e1001843.
- [3] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35 (4): 907 - 914.
- [4] Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review [J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8 (PMID: 12141971): 843 - 849.
- [5] 王兆芬,李斌,蒋明霞,等. 青海省 251 株结核分枝杆菌 Spoligotyping 基因型与 4 种一线药物耐药表型的研究 [J]. 中国人兽共患病学报 2017, 33(04): 332 - 336.
- [6] Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, et al. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W - Beijing family strains [J]. Trends in Microbiology 2002, 10(1): 45 - 52.
- [7] 徐东芳,刘海灿,赵秀芹,等. 391 株结核分枝杆菌基因分型研究和耐药性分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016(18): 2719 - 2720 + 2731.
- [8] Sun YJ, Lee A, Wong SY, et al. Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug - resistant tuberculosis in Singapore [J]. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2007, 11(4): 436 - 442.
- [9] 赵雁林,王黎霞,成诗明,等. 结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化操作程序及质量保证手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 15 - 25.
- [10] Weniger T, Krawczyk J, Supply P, et al. MIRU - VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of Mycobacterium tuberculosis complex bacteria [J]. Nucleic Acids Research 2010, 38(2): W326 - W331.
- [11] 邢进,赵玉玲. 河南省结核分枝杆菌间隔区寡核苷酸分型技术的应用研究 [J]. 河南预防医学杂志, 2014, 25(05): 321 - 324.
- [12] 赵秀芹,董海燕,刘志广,等. 中国部分地区结核分枝杆菌北京基因型菌株分布初步分析 [J]. 实用预防医学 2012, 19(5): 662 - 664.
- [13] 张建梅,郝蓉蓉,曾小红,等. 厦门市临床分离的 466 株结核分枝杆菌基因分型研究 [J]. 现代预防医学 2016, 43(22): 4159 - 4162.
- [14] Chen L, Pang Y, Ma L, et al. First insight into the molecular epidemiology of mycobacterium tuberculosis isolates from the minority enclaves of southwestern China [J]. Biomed Research International 2017, 2017(11): 2505172.
- [15] 刘志广,张选民,张媛媛,等. 结核分枝杆菌西安分离株北京家族基因型检测及其耐药相关性研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(5): 435 - 438.

收稿日期: 2017 - 12 - 08

读者 · 作者 · 编者

作者修稿注意事项

1. 作者应严格按编辑部提出意见修改,如果对某些意见修改时有困难,应作出适当解释,如果修改不合格,要再行退回修改,因此而延误文章刊出,作者自行负责;
2. 修改稿还需终审,因此文章即使修回,仍可能退稿;
3. 请尽量引用本刊参考文献,参考文献应在文中相应的引用处标出序号;
4. 请补充作者简介,包括姓名(出生年 -)、性

- 别、学历、职称、研究方向、联系方式(电话、E-mail);
5. 要求按四要素格式撰写摘要(目的、方法、结果、结论),表格应规范(三线表),文题尽量简化(<20字);
6. 概率 P 值前应给出具体检验值,如 χ^2 值 t 值, q 值等;
7. 通讯作者须注明 E-mail。