

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学号：21620120153779

UDC _____

廈門大學

博士学位论文

新型结核分枝杆菌间隔子寡核苷酸分型及
临床评价

A New Type of Spacer Oligonucleotide Typing for
Mycobacterium Tuberculosis Complex and Clinical
Evaluation

曾小红

指导教师姓名：李庆阁 教授

专业名称：生物化学与分子生物学

论文提交日期：2016年4月

论文答辩时间：2016年5月

学位授予日期： 年 月

答辩委员会主席：_____

评 阅 人：_____

2016年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘要.....	1
Abstract.....	3
第一章 绪论	6
第一节 结核病流行情况	6
第二节 结核分枝杆菌分型技术及临床应用	7
2.1 结核分枝杆菌遗传多态性.....	7
2.2 结核分枝杆菌分子分型方法.....	8
2.3 基因分型在临床中的作用.....	13
第三节 荧光探针熔解曲线分析技术	15
第四节 本论文的研究目的、内容和意义	16
参考文献	18
第二章 2D-Spoligotyping 分型体系的建立与评价	31
第一节 引言	31
第二节 材料与方法	32
2.1 菌株来源.....	32
2.2 核酸提取.....	33
2.3 PCR 仪器.....	33
2.4 检测探针和熔点标签序列设计.....	34
2.5 引物和杂交探针设计.....	36
2.6 2D-Spoligotyping 分型体系.....	38
2.7 重复性考察.....	38
2.8 对 NTM 特异性考察.....	39
2.9 阳性/阴性阈值设定.....	39
2.10 判读标准.....	40

2.11 灵敏度考察.....	41
2.12 MTB 临床标本评价.....	41
2.13 测序分析.....	41
第三节 结果	43
3.1 实验设计原理.....	43
3.2 熔点标签库建立.....	44
3.3 双管四色 2D-Spoligotyping 体系建立.....	45
3.4 灵敏度分析.....	46
3.5 重复性考察.....	47
3.6 对 NTM 特异性考察.....	48
3.7 阳性/阴性阈值设定.....	48
3.8 临床菌株评价.....	49
第四节 讨论	52
参考文献	57
第三章 McSpoligotyping 分型体系的建立与评价	61
第一节 引言	61
第二节 材料与方法	62
2.1 菌株来源.....	62
2.2 核酸提取.....	62
2.3 PCR 仪器.....	63
2.4 引物与探针设计.....	63
2.5 McSpoligotyping 分型体系.....	65
2.6 重复性考察.....	67
2.7 阳性/阴性 Rm 阈值设定.....	67
2.8 自动判读规则设定.....	67
2.9 灵敏度考察.....	69
2.10 对 NTM 特异性考察.....	69
2.11 MTB 临床标本评价.....	69
2.12 测序分析.....	69

第三节 结果	70
3.1 实验设计原理.....	70
3.2 三管四色 McSpoligotyping 体系建立	71
3.3 重复性考察.....	72
3.4 阳性/阴性阈值设定	73
3.5 灵敏度考察.....	74
3.6 对 NTM 特异性考察.....	75
3.7 MTB 临床标本评价	75
第四节 讨论	76
参考文献	78
第四章 McSpoligotyping 分型体系的多中心评价	80
第一节 引言	80
第二节 材料和方法	81
2.1 参考菌株.....	81
2.2 结核分枝杆菌临床分离株.....	81
2.3 DNA 提取.....	81
2.4 McSpoligotyping 分型方法.....	81
2.5 膜杂交 Spoligotyping 方法.....	82
2.6 测序分析.....	83
2.7 结果统计.....	83
第三节 结果	83
3.1 菌株纳入情况.....	83
3.2 两种方法分型结果一致性分析.....	84
3.3 临床试验菌株基因型多样性.....	85
3.4 临床试验菌株基因型聚类分析.....	86
3.5 临床试验菌株成簇特征.....	87
第四节 讨论	88
参考文献	97
第五章 结核分枝杆菌北京家族菌株与耐药相关性研究	100

第一节 引言	100
第二节 材料与方法	101
2.1 菌株来源.....	101
2.2 北京家族菌株统计.....	101
2.3 药敏信息收集.....	101
2.4 统计分析.....	102
第三节 结果	103
3.1 耐药情况分析.....	103
3.2 北京家族菌株分布.....	105
3.3 北京家族菌株与耐药相关性.....	105
第四节 讨论	113
参考文献	117
附表 1. 2D-Spoligotyping 分型体系杂交连接探针和引物序列	121
附表 2. 美国标本 Spoligotyping 分型结果	124
附表 3. 多中心验证 Spoligotyping 分型结果	130
英文缩写索引	136
博士期间发表交流论文	137
致谢	138

Contents

Abstract (in Chinese)	1
Abstract (in English)	3
Chapter 1 Introduction	6
Section 1 Overview of tuberculosis	6
Section 2 Genetic markers and application in epidemiological study	7
2.1 Genetic polymorphism in M.tuberculosis	7
2.2 Genotyping of M.tuberculosis	8
2.3 Application in epidemiological study	13
Section 3 Probe-based melting curve analysis	15
Section 4 Proposal of this thesis	16
References	18
Chapter 2 Establishment and evaluation of 2D-Spoligotyping	31
Section 1 Introduction	31
Section 2 Materials and methods	32
2.1 Clinical isolates	32
2.2 Nucleic acid extraction	33
2.3 PCR instruments	33
2.4 Design of detection probes and Tm tags	34
2.5 Design of hybridization probes and primers	36
2.6 Establishment of 2D-Spoligotyping	38
2.7 Reproducibility study	38
2.8 Specificity study for NTM	39
2.9 Cutoff Rm for positive/negative spacer	39
2.10 Definition criteria	40
2.11 Sensitivity of 2D-Spoligotyping	41

2.12 Clinical isolates detection	41
2.13 Sequencing	41
Section 3 Results	43
3.1 Design of 2D-Spoligotyping	43
3.2 Construction of Tm tags library	44
3.3 Establishment of 2D-Spoligotyping	45
3.4 Sensitivity of 2D-Spoligotyping	46
3.5 Reproducibility of 2D-Spoligotyping	47
3.6 Specificity study for NTM	48
3.7 Cutoff Rm for positive/negative spacer	48
3.8 Clinical isolates detection	49
Section 4 Discussion	52
References	57
Chapter 3 Establishment and evaluation of McSpoligotyping	61
Section 1 Introduction	61
Section 2 Materials and methods	62
2.1 Clinical isolates	62
2.2 Nucleic acid extraction	62
2.3 PCR instruments	63
2.4 Design of probes and primers	63
2.5 Establishment of McSpoligotyping.....	65
2.6 Reproducibility study	67
2.7 Cutoff Rm for positive/negative spacer	67
2.8 Definition criteria.....	67
2.9 Sensitivity of McSpoligotyping	69
2.10 Specificity study for NTM	69
2.11 Clinical isolates detection	69
2.12 Sequencing	69
Section 3 Results	70

3.1 Design of McSpoligotyping	70
3.2 Establishment of McSpoligotyping.....	71
3.3 Reproducibility of McSpoligotyping	72
3.4 Cutoff Rm for positive/negative spacer	73
3.5 Sensitivity of McSpoligotyping	74
3.6 Specificity study for NTM.....	75
3.7 Clinical isolates detection	75
Section 4 Discussion	76
References	78
Chapter 4 A multicenter validation of McSpoligotyping	80
Section 1 Introduction	80
Section 2 Materials and methods.....	81
2.1 Reference isolates	81
2.2 Clinical isolates.....	81
2.3 Nucleic acid extraction	81
2.4 McSpoligotyping.....	81
2.5 Membrane-based Spoligotyping	82
2.6 Sequencing.....	83
2.7 Statistical analysis.....	83
Section 3 Results.....	83
3.1 Strains enrollment	83
3.2 Concordance between two methods.....	84
3.3 Genetic diversity of clinical strains.....	85
3.4 Minimum spanning tree of clinical strains.....	86
3.5 Cluster level of clinical strains.....	87
Section 4 Discussion	88
References	97
Chapter 5 Study on relationship between <i>M.tuberculosis</i> Beijing	

strains and drug resistance	100
Section 1 Introduction	100
Section 2 Materials and methods	101
2.1 Clinical isolates.....	101
2.2 Beijing strains	101
2.3 Information of drug resistance	101
2.4 Statistical analysis.....	102
Section 3 Results	103
3.1 Distribution of drug resistance.....	103
3.2 Distribution of Beijing strains.....	105
3.3 Correlation of Beijing strains and drug resistance.....	105
Section 4 Discussion	113
References	117
Table S1. Sequences of hybridization probes and primers used in 2D-Spoligotyping	121
Table S2. Spoligotyping results of samples from foreign	124
Table S3. Spoligotyping results of samples from multi-center evaluation	130
List of abbreviations	136
List of Publications	137
Acknowledgements	138

摘要

结核病是当今世界范围内对人类健康最具威胁的传染性疾病之一，具有潜伏感染的特点，因此追踪传染源和查证传播途径是长期困扰结核病流行病学研究的一个问题，也是分子流行病学要解决的首要问题。基因分型技术是分子流行病学研究的一个有力工具，在研究结核病传播规律方面有着不可替代的优势。一个理想的基因分型技术应当具备简便、快速、结果可在不同实验室间进行比较等特点。本论文基于探针熔解曲线分析技术，建立新型的快速结核分枝杆菌分型体系，并评价其临床应用。论文内容如下：

第一章为绪论，首先概述了结核病目前的流行情况，阐述了结核分枝杆菌的分子分型技术及其在结核病防控中的作用，介绍了本论文所采用的探针熔解曲线分析技术，最后提出了本论文的研究目的、内容及研究意义。

第二章，基于二维熔点标签技术建立了双管四色 2D-Spoligotyping 分型体系。本体系利用 43 对杂交连接探针特异识别 43 个间隔子序列，通过连接检测反应与 PCR 扩增熔解反应两个步骤，可在 4 小时之内完成分型检测，最低检测限为 10^4 拷贝/反应。对美国新泽西大学公共卫生研究所结核病中心提供的结核分枝杆菌临床分离株进行分型检测，2D-Spoligotyping 与传统膜杂交 Spoligotyping 分型结果的符合率为 84.39% (411/487)，经测序分析，这些存在差异的间隔子序列确实存在，与本体系的结果一致，均由 IS6110 的插入而导致两种方法分型结果的差异。这些结果证明了本体系具有良好的间隔子检测特异性，同时为研究 DR 区域的进化提供实验数据。

第三章，利用探针熔解曲线分析技术建立了三管四色 McSpoligotyping 分型体系。本体系利用 43 条特异识别 43 个间隔子序列的双标记荧光检测探针，通过只需一个 PCR 扩增熔解反应，即可在 3 小时内得到分型结果。分型结果由软件自动读取并以国际通用的 43 位二进制码格式输出结果。整个检测过程手工操作时间约 30 分钟。体系的最低检测限为 50 拷贝/反应。对美国新泽西大学公共卫生研究所结核病中心提供的 520 份结核分枝杆菌临床分离株进行分型检测，McSpoligotyping 与传统膜杂交 Spoligotyping 分型结果的符合率为 99.02%。这些结果充分体现了本体系具有良好的检测灵敏度和特异性。

第四章，对上述建立好的 McSpoligotyping 分型体系进行临床多中心评价。在广州市胸科医院、沈阳市胸科医院、厦门市疾病预防控制中心和河南省疾病预防控制中心四家临床单位同时采用 McSpoligotyping 与传统膜杂交 Spoligotyping 对 2013-2014 年收集的结核菌临床分离株进行双盲分型检测，以测序为第三方验证，结果表明，McSpoligotyping 与传统膜杂交 Spoligotyping 分型结果的符合率为 97.66% (1922/1968)，正确率达到 99.29% (1954/1968)。分析所有菌株的基因型，我们共发现 215 种基因型，其中 133 种基因型在 SITVITWEB 数据库中已存在，其余 82 种为新的基因型。通过结核分枝杆菌的基因家族分析，我们发现了 7 个已知家族的成员，分别是 Beijing (81.93%)、T (9.81%)、H (1.65%)、EAI (0.73%)、LAM (0.60%)、MANU (0.37%) 和 CAS (0.08%)，其中 Beijing 家族是主要的流行家族。通过本次临床多中心评价，本体系具有简便、快速、特异性高、结果自动判读等优点，充分证明了其临床适用性。

第五章，针对上述临床多中心试验菌株的分型结果进一步分析北京家族菌株与耐药的相关性。结果显示，北京家族菌株与耐药的相关性存在着地域上的差异。对于四种一线药 (INH、RFP、EMB 和 SM)，北京家族菌株对 INH 的耐药率在广州地区显著高于非北京家族 ($P=0.004$, $OR=1.95$)，在其他地区并无明显差异；北京家族菌株对 SM 的耐药率在沈阳地区显著高于非北京家族 ($P=0.000$, $OR=4.46$)，在其他地区并无明显差异；在四个地区，北京和非北京家族菌株对 RFP、EMB 的耐药表现均无明显差异。对于抗结核二线药，广州地区的北京家族菌株表现出对 LFX ($P=0.050$, $OR=1.83$)、AMK ($P=0.048$, $OR=3.92$)、MOX ($P=0.016$, $OR=2.63$) 耐药的比例显著高于非北京家族菌株。同样是对二线药 LFX 和 AMK 的耐药分析，在沈阳地区北京和非北京家族菌株对这两种药的耐药表现并无明显差异。因此，无论是一线药或二线药，北京家族菌株对耐药表现都存在着地域上的差异。这也提示了，一度被认为遗传相似性极高的北京家族菌株，在不同地区存在着一定的遗传差异性。这些研究将为了解北京家族菌株与耐药的相关性、耐药结核病的传播特征提供重要的实验数据，对结核病的有效控制具有重要意义。

关键词：结核分枝杆菌；熔解曲线分析；Spoligotyping；耐药

Abstract

Tuberculosis (TB) is still a leading cause of death among infectious diseases worldwide. Tracking and transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by traditional contact investigation is limited due to the long latent period of *Mycobacterium tuberculosis*. Genotyping is used to track specific isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in a community. It has been successfully used in molecular epidemiologic research to study the transmission dynamics of TB. A ideal genotyping method to be used worldwide should be simple, affordable, a short turnaround time and the digital result that can be reproducible and shared between different laboratories. The aim of this thesis is to establish new systems for rapid genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* based on melting curve analysis and explore their applications in clinical.

In chapter one, we firstly reviewed the epidemiological profile of TB, followed by introduction of the genotyping methods of *Mycobacterium tuberculosis* and applications in clinical. We also described probe-based melting curve analysis as well as the fluorescent probes suitable for melting curve analysis. Finally, the aim, contents and meaningfulness of this thesis were given.

In chapter two, we developed a new assay, 2D-Spoligotyping, based on melting curve analysis and a 2D-labeling strategy for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. 43 pairs of hybridization probes were designed to identify 43 spacer sequences specifically. The assay need two steps for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping within 4 hours. The limit of detection of the assay was 10^4 genome DNA per reaction. The concordance between 2D-Spoligotyping and traditional membrane-based spoligotyping was 84.39%(411/487). Confirmed by DNA sequencing, discrepant spacers were all present with an extra *IS6110* copy insertion in DR region. The results were accordant with 2D-Spoligotyping assay, confirming that the new assay has a higher accuracy for identification of spacer sequences.

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.