

CyPA 有潜在的核酸酶活性。近年来对 CyPA 基因在利氏曼原虫和锥虫上的研究屡有报道^[12], 研究焦点集中于 CyPA 结构与其生物学功能。因此, 对微小隐孢子虫的 20K CyP 基因研究对于探讨隐孢子虫致病机制以及与 HIV 共感染关系具有重要意义。

本研究成功克隆出微小隐孢子虫 NJ 株的 20K CyP 基因序列。通过对隐孢子虫的不同分离株 20K CyP 核苷酸序列和氨基酸进行同源性分析发现, 虽然微小隐孢子虫的 NJ 株与 *C. parvum* Iowa II 20K CyP, TU Humosis 502 的 20K CyP 在个别核苷酸序列上有差异, 但是其所编码的氨基酸同源性 100%, 该基因结构域与人类亲环蛋白结构域具有相似性。结果显示隐孢子虫的 20K CyP 的基因序列高度保守。

参考文献

- [1] Hunter PR, Nichol G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(1): 145-154.
- [2] 付芹芹, 荆春霞, 杨光, 等. 微小隐孢子虫腺苷酸激酶基因克隆

- 及分析[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(7): 845-848.
- [3] 李发武, 向选东. 人体隐孢子虫分子流行病学研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2004, 20(8): 704-706.
- [4] 菅复春, 张龙现, 宁长申, 等. 隐孢子虫病免疫学研究进展[J]. 动物医学进展, 2005, 26(6): 9-12.
- [5] 陈甫, 黄克和. 建立微小隐孢子虫感染小鼠模型方法的研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(2): 195-198.
- [6] 杨光, 周天鸿, 李月琴, 等. 应用巢式 PCR 方法诊断微小隐孢子虫感染的实验研究[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(11): 1109-1111.
- [7] Wang P, Heitman J. The cyclophilins[J]. Genome Biology, 2005, 6(7): 226.
- [8] 李芳秋, 武建国. 亲环素 A 与 HIV-1 的感染性[J]. 医学研究生学报, 2001, 2(1): 54-56.
- [9] Saphire ACS, Bobardt MD, Gallay PA. Cyclophilin A plays distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 entry and postentry events, as revealed by spinoculation[J]. J Virol, 2002, 76(9): 4671-4677.
- [10] Bosco DA, Eisenmesser EZ, Pochapsky S, et al. Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A[J]. PNAS, 2002, 99(8): 5247-5252.
- [11] Yurchenko V, Zhu X, Sherry B, et al. Functional analysis of *Leishmania* major cyclophilin[J]. International Journal for Parasitology, 2008, 38: 633-639.
- [12] 胡奇丰, 柳建发, 蒋雯雯, 等. 环孢素 A 抗寄生虫的作用[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(1): 72-75.

收稿日期: 2012-01-05

(解学魁编辑 潘雯校对)

· 实验研究 ·

福建省耐多药结核分枝杆菌 MLVA 分型分析*

陈求扬^{1,2}, 梁庆福^{1,2}, 林建¹, 林淑芳^{1,2}, 赵永¹, 魏淑贞¹, 逢宇³, 郑金凤^{1,2}, 王玉锋³, 赵雁林³

摘要:目的 了解福建省耐多药结核分枝杆菌分子流行病学特征, 为控制耐多药肺结核提供参考依据。方法 采用多位点数目可变串联重复序列基因分型(MLVA)方法, 对 30 个监测点纳入监测的所有耐多药结核分枝杆菌分离菌株 DNA 进行检测, 使用 BioNumerics (Version 4.5) 软件进行聚类分析。结果 76 株耐多药结核分枝杆菌被分为 I、II、III 三大基因群, 分别包含 I 群 5 株(6.6%)、II 群 68 株(89.5%)、III 群 3 株(3.9%); 在株水平基因分型上, 有 19 株菌成 7 簇, 各包含 2~4 株菌, 成簇菌株来源于同一县区或不同县区。结论 福建省耐多药结核分枝杆菌菌株主要流行株为 II 群菌株; 部分菌株存在县区内, 甚至跨县域的近期传播流行。

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; 耐多药

中图分类号: R 378.91+1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)01-0061-03

Genotyping of multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Fujian province with multiple loci variable number tandem repeat analysis

CHEN Qiu-yang*, LIANG Qing-fu, LIN Jian, et al (* Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention, Fujian Province Key Laboratory of Zoonosis, Fuzhou, Fujian Province 350001, China)

Abstract: Objective To explore the characteristics of molecular epidemiology of multi-drug *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Fujian province, and to provide reference for multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) control. **Methods** All MDR-TB isolates were selected from 30 survey sites, and the bacterial DNA of these strains were detected by PCR to amplify the loci simultaneously with multiple variable number tandem repeat analysis (MLVA), and the clustering of genotypes was analyzed with BioNumerics (Version 4.5). **Results** Through MLVA, 76 strains of multi-

* 基金项目: 福建省自然科学基金(2010J01116)

作者单位: 1. 福建省疾病预防控制中心 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福州 350001; 2. 福建省医科大学公共卫生学院教学基地; 3. 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心国家结核病参比实验室

作者简介: 陈求扬(1952-), 男, 福建人, 主任医师, 大专, 研究方向: 结核病防治。

drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* were divided into 3 genogroups, i. e. I, II, III genogroup. The I genogroup consists of 5 strains (6.6%), II genogroup consists of 68 strains (89.5%), and III genogroup consists of 3 strains (3.9%). At the strain level, 19 isolates were categorized into 7 clusters, each cluster including 2–4 strains, and the clustering strains were collected from the same county or different county. **Conclusion** The strain of II genogroup is the main epidemic strain in Fujian province, and some genotypes of strains spread recently in some county, even spread across counties. We should strengthen the control of drug resistant tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; MLVA; genotype; multi-drug resistance

目前,中国结核病控制面临三大严峻挑战:耐药药问题、流动人口和艾滋病/结核双重感染^[1]。2007—2008 年全国耐药性基线调查结果显示,我国结核总耐药率为 8.32%,其中初治肺结核耐药率为 5.7%,复治耐药率为 25.6%,据此估算我国每年大约新发 11 万例耐药肺结核(multi-drug-resistant tuberculosis, MDR-TB)患者^[2]。福建省最新耐药监测数据显示,肺结核耐药率为 4.6%^[3]。为了解福建省耐药结核分枝杆菌基因分型分布特征,为耐药肺结核病控制提供分子流行病学信息,本研究采用多位点数目可变串联重复序列基因分型(multiple loci VNTR analysis, MLVA)方法,对 2010 年 7 月—2011 年 6 月福建省耐药监测分离的 76 株耐药结核分枝杆菌进行基因分型分析,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 耐药结核分枝杆菌菌株采集自 2010 年 7 月—2011 年 6 月福建省结核病耐药性监测 30 个监测点纳入的 76 株耐药分离菌株。所获得菌株均得到患者知情同意。结核分枝杆菌标准株 H37Rv 由国家结核病参比室提供。

1.2 主要试剂 2×PCR-Mix(2 倍 PCR 预混液)、100 bp DNA ladder(上海基星生物科技有限公司)。

1.3 结核分枝杆菌 DNA 制备 将结核分枝杆菌临床分离株常规接种于改良罗氏培养基,37℃ 培养 2~4 周,至有菌落生长后,取一菌环菌于 400 μL TE 缓冲液中悬菌,100℃ 煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 10 min 后,上清液用于基因分型实验。

1.4 MLVA 检测

1.4.1 引物设计与合成 参照文献[4–5]和细菌基因数据库,初步筛选 15 个串联重复基因位点。引物由上海生工基因技术有限公司合成。

1.4.2 反应体系及反应条件 采用 20 μL 反应体系,其中含上、下游引物各 0.5 μL(10 μmol/L),2×Taq PCR Master Mix 10 μL, DNA 模版 2 μL,双蒸水 7 μL 补充至反应体积。PCR 反应条件:预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 1 min,退火 58℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,35 个循环;终延伸 72℃ 10 min;4℃ 保存。

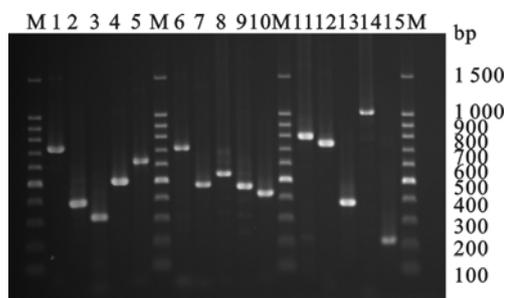
1.4.3 结果检测 取 3 μL 扩增产物,在 2% 的琼

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 的溴化乙锭染色液中,染色 30 min,自来水脱色 5 min。在紫外凝胶成像分析系统下观察结果,用 100 bp DNA Marker 确定相对分子质量大小,以标准菌株 H37Rv 作为对照。

1.5 统计分析 采用 Gel-Pro analyzer 4.0 软件对凝胶进行数字化处理,将指纹图谱数字化后,运用 BioNumerics(Version 4.5)数据库软件进行聚类分析,将实验菌株进行分型处理。

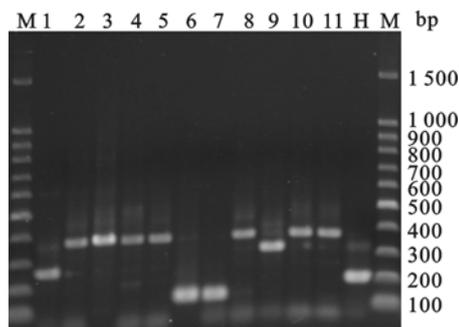
2 结果

2.1 可变数目串联重复序列(variable number tandem repeats, VNTR)多态性检测(图 1、2) 本研究共选取 15 个 VNTR 位点,76 株耐药结核分枝杆菌菌株进行基因分型,结果显示,不同菌株 DNA 指纹图谱呈现出明显多态性。



注: M: 分子量标准; 1: Mtub 04; 2: ETRC; 3: MIRU 04 (ETRD); 4: MIRU 40; 5: MIRU 10; 6: MIRU 16; 7: Mtub 21; 8: QUB-11b; 9: ETRA; 10: Mtub 30; 11: MIRU 26; 12: MIRU 31 (ETRE); 13: Mtub 39; 14: QUB-26; 15: QUB-4156。

图 1 福建省 1 株结核分枝杆菌菌株 15 个 VNTR 基因位点多态性检测结果



注: M: 分子量标准; H: H37Rv; 1~11: 350694, 350699, 350729, 350816, 350844, 350861, 350914, 350921, 350947, 351008, 351028。

图 2 部分结核分枝杆菌菌株在 Mtub 21 位点多态性检测结果

2.2 VNTR 基因分型分析(表 1) 76 株耐多药结核分枝杆菌根据 VNTR 重复次数,经 BioNumerics 软件聚类分析后分为 I、II、III 三大基因群,分别包含 I 群 5 株(6.6%)、II 群 68 株(89.5%)、III 群 3 株(3.9%),其中最大基因群 II 群包含 68 株(89.5%)结核分枝杆菌。在株水平分类上 76 株结核分枝杆菌分为 64 个基因型,其中 57 株为单菌株独立基因型,其余 19 株菌成 7 簇,各包含 2~4 株菌,成簇菌杆来源于同一县区或不同县区,具体构成见表 1。

表 1 成簇菌株构成情况

| 成簇组别 | 菌株数 | 菌株编号 | 菌株来源 | 基因群 |
|------|-----|--------|------|-----|
| A1 | 4 | 350264 | 连江县 | II |
| | | 351333 | 鲤城区 | II |
| | | 351334 | 鲤城区 | II |
| | | 351336 | 鲤城区 | II |
| A2 | 2 | 350651 | 湖里区 | II |
| | | 351028 | 仙游县 | II |
| A3 | 2 | 350110 | 闽侯县 | II |
| | | 352845 | 古田县 | II |
| A4 | 2 | 352918 | 周宁县 | II |
| | | 352919 | 周宁县 | II |
| A5 | 2 | 350699 | 湖里区 | II |
| | | 352536 | 建阳市 | II |
| A6 | 2 | 351306 | 鲤城区 | II |
| | | 351331 | 鲤城区 | II |
| A7 | 3 | 351446 | 洛江区 | III |
| | | 351448 | 洛江区 | III |
| | | 351458 | 洛江区 | III |

3 讨论

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 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^[4-10]。本研究采用该方法,对福建省耐多药结核分枝杆菌分离菌株进行基因分型,结果显示 76 株耐多药菌株可被分成 3 个主要基因群,其中以 II 群为主,表明这些菌株属于 1 个亲缘关系很近的克隆系,为福建省主要流行菌株。以往研究发现福建省北京基因型呈较高水平流行^[11],由于时间有限,本次研究未同时进行 spoligotyping 方法比较分析,II 群菌株是否为北京基因型,有待进一步研究。

结核病成簇病例通常为近期传播造成^[12]。通

过聚类分析结果显示,在株水平基因分型方面,所有菌株中有 19 株菌成 7 簇,各包含 2~4 株菌。进一步分析提示福建省监测点中的鲤城区、洛江区和周宁县耐多药结核分枝杆菌存在县区内近期传播,另外还存在跨县区、跨地区近期传播情况,如鲤城区与连江县、湖里区与仙游县、湖里区与建阳市、闽侯县与古田县之间的传播流行。因此,福建省耐多药结核分枝杆菌流行状况不容忽视,今后要进一步加强全省结核病控制规划的落实,特别要监控流动人口患者的全程督导管理,减少耐多药菌株的产生和传播,以有效控制耐多药结核病的流行。

参考文献

- [1] 王黎霞. 中国结核病防治工作现状分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(4): 413-414.
- [2] Zhao YL, Xu SF, Wang LX, et al. National survey of drug-resistant tuberculosis in China[J]. N Engl J Med 2012; 366: 2161-2170.
- [3] 梁庆福, 陈求扬, 赵永, 等. 福建省结核病耐药性监测结果分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(4): 420-422.
- [4] 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.
- [5] 王均, 黄延凤, 张爱华, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1408-1410.
- [6] 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, 24(6): 505-509.
- [7] 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.
- [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] 刘芮汐, 李奇志, 幸琳琳, 等. MIRU-VNTR 和 Spoligotyping 用于重庆地区 210 株儿童结核分枝杆菌临床分离株的基因分型[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(6): 593-597.
- [10] Wang J, Liu Y, Zhang CL, et al. Genotypes and characteristics of clustering and drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates collected in Heilongjiang province, China [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1354-1362.
- [11] 梁庆福, 陈求扬, 赵永, 等. 福建省畲族人群结核分枝杆菌 IS6110DNA 指纹图谱特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 926-929.
- [12] 王海英, 刘志敏, 徐勇, 等. 结核分枝杆菌基因分型技术的应用[J]. 国外医学: 微生物学分册, 2004, 27(6): 34-38.

收稿日期: 2012-06-07

(潘雯编校)