

# 贵州省结核分枝杆菌 VNTR 基因座筛选优化及其在 MLVA 分型中的应用

陈依江<sup>1,2</sup>, 童毅<sup>1,2</sup>, 杨幸贵<sup>1,2</sup>, 郑雯琳<sup>1,2</sup>, 白贵欢<sup>3</sup>, 莫祖甄<sup>3</sup>, 韦小瑜<sup>1,2,3</sup>, 李世军<sup>1,2,3</sup>, 黄俊飞<sup>1,2,3</sup>

1. 贵州省疾病预防控制中心, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州省微生物组与传染病防控重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵州 贵阳 550004

**摘要:**目的 应用基于 24 个 VNTR 位点的多基因座可变数量串联重复序列分析(MLVA)技术对贵州省结核分枝杆菌进行基因分型研究, 筛选出适合贵州结核分枝杆菌菌株的 VNTR 分型基因座, 建立分辨力高、操作简便的结核分枝杆菌 MLVA 分型模型, 为贵州省结核病传染源的追踪溯源、传播及防控提供技术手段。方法 收集来自贵州省的 124 株结核分枝杆菌菌株, 采用结核分枝杆菌国际通用的 24 个 VNTR 基因座进行 PCR 扩增, 应用毛细管电泳法对扩增产物进行分析, 统计各基因座的重复数, 计算等位基因多态性及各基因座分辨指数, 使用 BIONUMERICS 8.0 对受试菌株进行聚类分析, 探索贵州省结核分枝杆菌的 24-VNTR、15-VNTR、12-VNTR、8-VNTR 分型特征。结果 24 个 VNTR 基因座等位基因多态性及分辨指数显示: 分辨力高的基因座基因有 QUB-11b 等 7 个基因座, 分辨力中等的有 MIRU-10 等 11 个基因座, 分辨力低的有 MIRU-20 等 6 个基因座; 此外, 聚类分析显示: 24-VNTR 分型能力最强, 分辨力高达 95.16% (118/124), 接近单菌株鉴定水平, 依次 15-VNTR 分辨力为 91.13% (113/124)、12-VNTR 分辨力为 90.32% (112/124)、8-VNTR 分辨力为 83.06% (103/124)。以上 4 种 VNTR 分型模型均能将 124 株结核分枝杆菌菌株分为 4 个种群。结论 本研究评估筛选出了以 QUB-11b 等 6 个高分辨力基因座为贵州省结核分枝杆菌菌株 MLVA 分型首选, 其他基因座依据其分辨力排序作为补充的分型方法。其中 24-VNTR、15-VNTR 及 12-VNTR 具有较高分型能力, 可为贵州省结核病分子溯源提供技术支持。

**关键词:** 结核分枝杆菌, MLVA 分型, VNTR 基因座, 贵州省

中图分类号: R52 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2025)03-526-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202409313

## Optimization of VNTR loci screening and its application in MLVA typing of mycobacterium tuberculosis in Guizhou province

CHEN Yi-jiang<sup>\*</sup>, TONG Yi, YANG Xing-gui, ZHENG Wen-lin, BAI Gui-huan, MO Zu-zhen, WEI Xiao-yu, LI Shi-jun, HUANG Jun-fei

<sup>\*</sup>Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang, Guizhou 550004, China

**Abstract: Objective** To conduct genetic typing of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in Guizhou Province using the MLVA technique based on 24 VNTR loci, to identify VNTR typing loci suitable for Guizhou MTB strains, and to establish a high-resolution, user-friendly MLVA typing model for MTB. This model will provide technical means for tracing the sources, transmission, and prevention and control of tuberculosis in Guizhou Province. **Methods** A total of 124 MTB strains were collected from Guizhou Province. PCR amplification was performed using 24 internationally recognized VNTR loci for MTB, followed by analysis of the amplification products using capillary electrophoresis. The number of repeats at each locus was counted, and allele polymorphism and the discriminatory index for each locus were calculated. Clustering analysis of the tested strains was conducted using BIONUMERICS 8.0 to explore the typing characteristics of MTB in Guizhou Province based on 24-VNTR, 15-VNTR, 12-VNTR, and 8-VNTR. **Results** The allele polymorphism and discriminatory index of the 24 VNTR loci indicated that seven loci, including QUB-11b, had high discriminatory power, eleven loci, including MIRU-10, had moderate power, and six loci, including MIRU-20, had low power. Furthermore, clustering analysis revealed that the 24-VNTR typing exhibited the highest discriminatory ability at 95.16% (118/124), approaching the level of single strain identifica-

**基金项目:** 贵州省科技计划项目(黔科合基础—ZK[2024]—一般 616); 贵州省微生物组与传染病防控重点实验室项目(ZDSYS[2023]004); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwbj2021-431, gzwbj2021-433, gzwbj2017-1-086); 贵州省疾病预防控制中心科学(青年)技术基金项目(2020-E1-3 青)

**作者简介:** 陈依江(1973—), 女, 本科, 副主任医师, 研究方向: 病原微生物研究

**通信作者:** 黄俊飞, E-mail: junfeihuang@163.com

tion, followed by 15-VNTR at 91.13% (113/124), 12-VNTR at 90.32% (112/124), and 8-VNTR at 83.06% (103/124). All four VNTR typing models successfully categorized the 124 MTB strains into four clusters. **Conclusion** This study identified six high-resolution loci, including QUB-11b, as the preferred VNTR loci for MLVA typing of MTB strains in Guizhou Province, with other loci ranked according to their discriminatory power as supplementary typing methods. The 24-VNTR, 15-VNTR, and 12-VNTR methods demonstrated high typing capabilities, providing technical support for molecular tracing of tuberculosis in Guizhou Province.

**Keywords:** Mycobacterium tuberculosis; MLVA typing; VNTR loci; Guizhou Province

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 引起的一种重大传染病, 可复发和再发, 是重大的公共卫生疾病, 2022 年全球范围内新发病例约 1 060 万例 (133/10 万)<sup>[1]</sup>。中国仍是世界上 30 个结核病高负担国家之一, 2022 年结核病患者数量居世界第 3 位, 约 74.8 万 (52/10 万), 占全球 7.1%<sup>[1]</sup>。贵州省是结核病疫情高发省份, 根据结核病网报系统查询 2022 年新发结核病患者约 2.9 万例, 发病率占全省总人数 76.2/10 万, 远高于全国平均水平, 依然是严重影响贵州公共卫生的主要疾病。

结核分枝杆菌基因分型是结核病防治的重要监测手段, 尤其在结核病传染源的溯源以及流行趋势判断发挥着至关重要的作用<sup>[2]</sup>。常用的分型方法包括插入 IS6110 限制性片段长度多态性 (IS6110-RFLP)、间隔区寡核苷酸分型 (spoligotyping)、长片段多态性分析 (LSP)、多基因座可变数量串联重复序列分析 (MLVA)、多基因座序列分型 (MLST) 和单核苷酸多态性 (SNP) 分析等<sup>[2-6]</sup>。其中 MLVA 是目前最常用的一种分型技术, 该技术通过对结核分枝杆菌标准株 (H37Rv) 基因组分析获得可变量目串联重复序列相对应的片段 (大小在 52~77bp 之间), 并对重复单位相应基因座进行扩增确定扩增产物的大小, 计算重复数<sup>[7]</sup>。该分型技术具有操作简便、重复性好、分辨力高等优点<sup>[8-9]</sup>。本研究采用国际通用的 24 个 VNTR 基因座对贵州省地区的结核分枝杆菌进行基因分型研究, 并通过分析各基因座的基因分型能力, 筛选出适合贵州省结核分枝杆菌 MLVA 分型基因座, 为贵州省结核病传染源的追踪溯源、传播和遗传学等研究提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 结核分枝杆菌 124 株, 收集于 2021 年贵州省地区; 结核分枝杆菌标准株 H37Rv (ATCC27294) 由国家疾控提供; 以上菌株均保存于贵州省疾病预防控制中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 自动核酸提取仪 (NP968-C) 及配套的细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天隆科技, 中国西安), 罗氏培养基 (珠海贝索), 移液器 (美国 Thermo), 核酸片段分析仪 (ABI 3730-XL, 美

国), PCR 扩增仪 (LifeTouch, 杭州博日科技股份有限公司, 中国), 生物安全柜 (NU-440-600E, 美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌菌株鉴定 应用分枝杆菌含药罗氏培养基 PNB (对硝基苯甲酸, 500  $\mu\text{g/ml}$ )、TCH (噻吩-2-羧酸胍, 5  $\mu\text{g/ml}$ ) 及中性罗氏培养基对收集菌株培养 3~4 周进行鉴定。

1.2.2 结核分枝杆菌基因组 DNA 提取 鉴定后的菌株, 在生物安全柜中挑取 1~2 环菌株, 转移至盛有 0.5ml 1 $\times$  TE 缓冲液的 EP 管中, 置于金属浴上 85 $^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min, 然后 12 000 r/min (离心半径 7.5 cm) 离心 2 min, 弃去上清液, 按照试剂盒步骤提取核酸, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.3 VNTR 基因座扩增及产物检测 参照国际通用的 24 个 VNTR 基因座<sup>[10]</sup>, 引物序列及荧光标记见表 1, 引物由北京天一辉远生物技术有限公司合成。PCR 体系: 2 $\times$  Taq Mix 25  $\mu\text{l}$ , 上下游引物各 2.5  $\mu\text{l}$ , 核酸模板 5  $\mu\text{l}$ , 纯水 15  $\mu\text{l}$ 。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 59 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。将 24 个 VNTR 基因座分成 8 组, 每组 3 个基因座, 并用荧光进行标记, 同组可在同一反应体系中扩增也可单个基因座扩增, PCR 产物应用基于毛细管电泳的核酸片段分析仪 (ABI 3730-XL) 进行检测, 记录基因座结果, 并计算重复数。

1.2.4 VNTR 基因座遗传多态性及分辨能力分析 本研究分别用等位基因多态性 (Allelic diversity) 及各基因座分辨指数 (hunter-gaston discriminatory Index, HGDI) 来分析应用的 24 个 VNTR 基因座<sup>[8-9, 11]</sup>, 公式如下: 等位基因多态性  $h=1-\sum x_i^2 / [(n/n-1)]$  (其中  $x_i$  表示第  $i$  个基因的频率,  $n$  为总菌株数),  $h$  值越大表示多态性越好,  $h>0.60$  表示多态程度性较好,  $0.30 \leq h \leq 0.60$  表示多态性程度中等,  $h<0.30$  表示多态性

程度较差; 各基因座分辨指数  $HGDI=1-\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j [n_j/n_j-1]$  ( $N$  表示总菌株数,  $S$  为分型方法划分的总类型数,  $n_j$  为第  $j$  个基因的菌株数), 指数值越高其分辨能力越强。

1.2.5 不同 VNTR 基因座模型的 MLVA 聚类及最小

间距分析 依据 VNTR 基因座的多态性(h)及分辨指数(HGDI)值的大小排序,分别由高到低选择不同数量的基因座构建 24-VNTR 基因座、15-VNTR 基因座、12-VNTR 基因座和 8-VNTR 基因座的分析模型,见表 1。应用 BIONUMERICS 8.0 软件对菌株的 VNTR

基因座采用非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)进行聚类分析,同时进行最小间距图分析,并对比模型间的差异。数据采用 SPSS 19.0 软件进行 Pearson  $\chi^2$  检验分析,检验水准  $\alpha=0.05$ 。

表 1 结核分枝杆菌 24 个 VNTR 基因座基本信息

Table 1 The basic information of 24 VNTR loci for MTB

基因座	PCR 引物序列及荧光标记位置 (5' to 3')	重复单元长度	H37Rv 重复单元数	别名
MIRU-04	GCCGCAGAGCCCCGAAGTGC (FAM) GCCGAGCAGAAAACGCCAGC	77	3	ETR-D
MIRU-26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGCGGACCAGGCCAATAG (VIC)	51	3	
MIRU-40	GGGTTGCTGGATGACAACGTGT (NED) GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	54	1	
MIRU-10	GTTCTTGACCAACTGCAGTCTGTC GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT (FAM)	53	3	
MIRU-16	TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAAGTA CCCCTCGTGCAGCCCTGGTAC (VIC)	53	2	
MIRU-31	ACTGATGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGCTCTTGAT (NED)	53	3	ETR-E
VNTR-42	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT GGCAGCAGAGCCCGGATTCTTC (FAM)	51	2	Mtub04
VNTR-43	CGAGACTGGCACTGGCGGTTATCT (VIC) AATGACTTGAACCGCAAATTTGTA	58	4	ETR-C
ETR-A	AAATCGGTGCCATCACCTTCTTAT (NED) CGAAGCCTGGGGTGCCCGGATTT	75	3	
VNTR-47	CTTGAAGCCCGGTCTCATCTGT (FAM) ACTTGAACCCACGCCATTAGTA	58	2	Mtub30
VNTR-52	CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC (VIC) TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	58	5	Mtub39
VNTR-53	TGACCACGGATTGCTCTAGT GCCGGCTCCATGTT (NED)	59	2	QUB-4156c
QUB-11b	CGTAAGGGGGATCGCGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT (FAM)	69	5	
VNTR-1955	AGATCCCACTTGTCTCGTCTC (VIC) CAACATCGCCTGCTTCTGTA	57	2	Mtub21
QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGAT (NED) CGGCCGTGCCGCCAGTCTTCCCGAT	111	5	
MIRU-02	TGGACTTGCAGCAATGGACCAACT TACTCGGACGCGGCTCAAAAAT (FAM)	52	2	
MIRU-23	CTGTCTGATGGCCGCAAAAACG (VIC) AGCTCAACGGGTTCCGCCCTTTTGTCT	53	6	
MIRU-39	CGCATCGACAAAAGTGGAGCCAAAC CGGAAACGTCTACGCCCCACACAT (NED)	53	2	
MIRU-20	TCCGAGAGATGCCCTTCGAGTTAG (FAM) GGAGACCGGACCAGGTACTTCTA	77	2	
MIRU-24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT GGGCCAGTTGAGCTCACAGAA (VIC)	54	1	
MIRU-27	TCCAAAAGCCTCTGCCGTGCCAGTAA GGCATGTGAGCGTGCCACTCAA (NED)	53	3	QUB-5
VNTR-46	GCCAGCGCCGTCATAAACCT (FAM) AGCCACCCGGTGTGCCTTGTATGAC	57	4	Mtub29
VNTR-48	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT (VIC) CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	57	3	ETR-B
VNTR-49	GGTCCGACCTGCTCCAGATAA (NED) GGCTCTCATTGCTGGAGGTTGTAC	54	3	Mtub34

## 2 结果

**2.1 结核分枝杆菌 24 个 VNTR 基因座遗传多态性及分辨能力** 124 株结核分枝杆菌各基因座的重复数为 1~13 不等(参考菌株 H37Rv 各基因座的重复数为 1~5)。如表 2 所示, *h* 及 HDGI 最高的为 QUB-11b (*h*=0.843, HDGI=0.851), 最低的为 MIRU-02(*h*=0.008, HDGI=0.016)。其中有 7 个基因座分辨指数 HGDI>0.60, 分别为 QUB-11b、VNTR-1955、VNTR-53、MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、VNTR-42, 可选择为贵州省结核分枝杆菌 MLVA 分型首选的

VNTR 基因座;有 11 个分辨力中等的基因座,可按照分辨率指数值的大小选择性的组成不同 VNTR 基因座数量的分型模型;有 6 个分辨力较低的基因座,可作为补充基因座以提高贵州省结核分枝杆菌 MLVA 分型的分型能力。此外,部分菌株某些基因座出现缺失,在 VNTR-53 基因座上缺失较多,达 16.94% (21/124), MIRU-26、MIRU-31、ETR-A、MIRU-16、QUB-26、MIRU-20 基因座中有少数缺失,在 0.81%~4.03%范围。

表 2 124 株结核分枝杆菌 24 个 VNTR 基因座重复单位及多态性分布  
Table 2 The repeat numbers and allelic diversity of 24 VNTR loci for 124 MTB strains

序号	VNTR 基因座	拷贝数														<i>h</i>	HDGI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	None		
1	QUB-11b	11	13	24	20	20	25	10	1	0	0	0	0	0		0.843	0.851
2	VNTR-1955	0	22	2	45	30	22	1	2	0	0	0	0	0		0.744	0.752
3	VNTR-53	0	1	0	0	0	0	0	0	0	36	49	17	0	21	0.739	0.745
4	MIRU-26	0	0	1	0	0	10	4	3	16	30	53	4	2	1	0.730	0.739
5	MIRU-31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	51	10	49	4	0.658	0.667
6	ETR-A	1	0	0	18	43	58	2	0	0	0	0	0	0	2	0.637	0.647
7	VNTR-42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	36	17	66		0.609	0.617
8	MIRU-10	0	0	0	0	0	0	0	0	2	61	52	9	0		0.573	0.581
9	MIRU-40	0	0	0	0	0	0	15	36	72	1	0	0	0		0.560	0.568
10	VNTR-52	0	0	0	0	27	80	10	5	2	0	0	0	0		0.524	0.532
11	MIRU-39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	70	50	1		0.514	0.522
12	VNTR-47	0	0	0	0	59	1	64	0	0	0	0	0	0		0.504	0.511
13	VNTR-43	0	0	0	0	38	86	0	0	0	0	0	0	0		0.420	0.427
14	MIRU-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	92	3	5	0.407	0.415
15	VNTR-48	0	0	0	0	0	31	93	0	0	0	0	0	0		0.370	0.378
16	MIRU-04	0	0	1	98	8	15	1	1	0	0	0	0	0		0.351	0.359
17	MIRU-27	0	0	0	0	0	0	0	0	2	23	97	2	0		0.348	0.356
18	QUB-26	0	102	1	3	8	8	0	0	0	0	0	0	0	2	0.309	0.317
19	MIRU-20	0	0	0	0	0	5	114	1	0	0	0	0	0	4	0.146	0.154
20	VNTR-46	0	0	0	0	0	0	3	1	114	3	3	0	0		0.146	0.154
21	MIRU-23	0	0	0	1	0	2	118	3	0	0	0	0	0		0.086	0.094
22	VNTR-49	0	0	0	0	0	3	2	118	1	0	0	0	0		0.086	0.094
23	MIRU-24	0	0	0	0	0	0	121	3	0	0	0	0	0		0.039	0.048
24	MIRU-02	0	0	0	0	0	0	0	1	123	0	0	0	0		0.008	0.016

**2.2 贵州省结核分枝杆菌聚类及遗传间距分析** 24-VNTR、15-VNTR、12-VNTR 及 8-VNTR 基因座模型聚类分析如图 1, 构建的 15-VNTR、12-VNTR、8-VNTR 均能同 24-VNTR 将 124 株结核分枝杆菌聚类成 4 个基因群;聚类分析结果显示 24-VNTR 分型能力最强,分辨力高达 95.16%(118/124),接近鉴定个体菌株水平;其次 15-VNTR 分辨力为 91.13%

(113/124),12-VNTR 分辨力为 90.32%(112/124),8-VNTR 分辨力为 83.06%(103/124);15-VNTR、12-VNTR 分析模型与 24-VNTR 分析模型相比分辨能力无统计学意义 ( $P>0.05$ ),8-VNTR 模型与 24-VNTR 分析模型相比分辨能力有统计学意义( $P<0.05$ )。

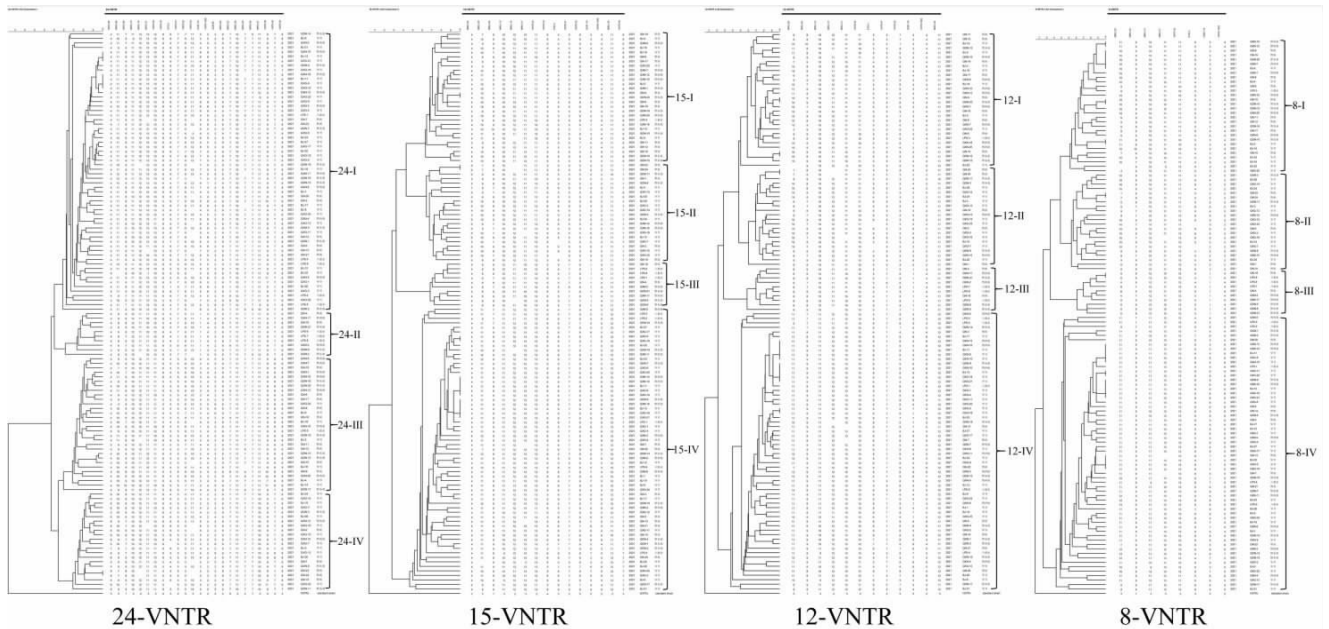


图 1 124 株结核分枝杆菌不同 VNTR 基因座的 MLVA 分型聚类  
 Figure 1 The cluster tree in different VNTR loci model for 124 MTB strains

通过对各基因群所含的菌株进行分析发现:8-I 群与 12-I 群、8-II 群与 12-II 群、8-III 群与 12-III 群、8 群-IV 与 12-IV 群所含的菌株完全一致;12-I 群比 15-I 群多 1 株菌(编号为 BJ-22),其余一致,12-II 群与 15-II 群、12-III 群与 15-III 群所含的菌株一致,12 群-IV 比 15-IV 群少 1 株菌(编号为 BJ-22),其余一致;15-I 群比 24-III 群少 1 株菌(编号为 QDN-17),其余一致,15-II 群与 24-IV 群、15-III 群与 24-II 群所含的菌株一致,15-IV 群比 24-I 群多 1 株菌(编号为 QDN-17),其余一致。见图 2。

1 个簇,在 15-IV 群形成 3 个簇;12-VNTR 将 124 株结核分枝杆菌分成 112 个基因型,其中在 12-I 群形成 2 个簇,在 12-II 群形成 1 个簇,在 12-IV 群形成 3 个簇;8-VNTR 将 124 株结核分枝杆菌分成 103 个基因型,其中在 8-I 群形成 4 个簇,在 8-II 群形成 1 个簇,在 8-III 群形成 1 个簇,在 8-IV 群形成 4 个簇。见图 1、3。

### 3 讨论

结核分枝杆菌的基因分型有助于结核病的控制,可阐明结核病患者之间可能的流行病学联系、判断是否暴发疫情、实验室交叉污染的检测,以及区分复发病例的外源性再感染和内源性再感染<sup>[1]</sup>。结核分枝杆菌的 MLVA 分型是基于分枝杆菌散置的重复单元(mycobacterial interspersed repetitive units, MIRUs)中可变数量串联重复序列(variable-number tandem repeat, VNTR)的分析<sup>[11-13]</sup>。不同国家和地区选用的 VNTR 基因座会有不同<sup>[10]</sup>,常用的 15-VNTR 基因座的分型模型已经在中国许多地区得到了应用和评估<sup>[8-9, 14-18]</sup>,本研究主要通过对贵州省地区结核分枝杆菌 24 个 VNTR 基因座进行分析,优化贵州省结核分枝杆菌 MLVA 分型的 VNTR 基因座选择。

在基于 VNTR 基因座的 MLVA 分型中随着选择的基因座个数增多,其实验操作程序也增多,为了简便、快速、低成本的应用 MLVA 技术对结核分枝杆菌进行分型,大多数的研究报道多采用 15 个 VNTR 基因座的分型模型直接进行研究。陈旭等<sup>[9]</sup>研究人员虽然也采用了基于 15 个 VNTR 基因座对贵州省的结

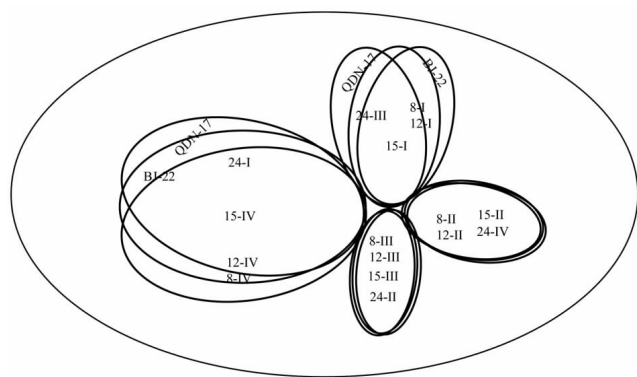
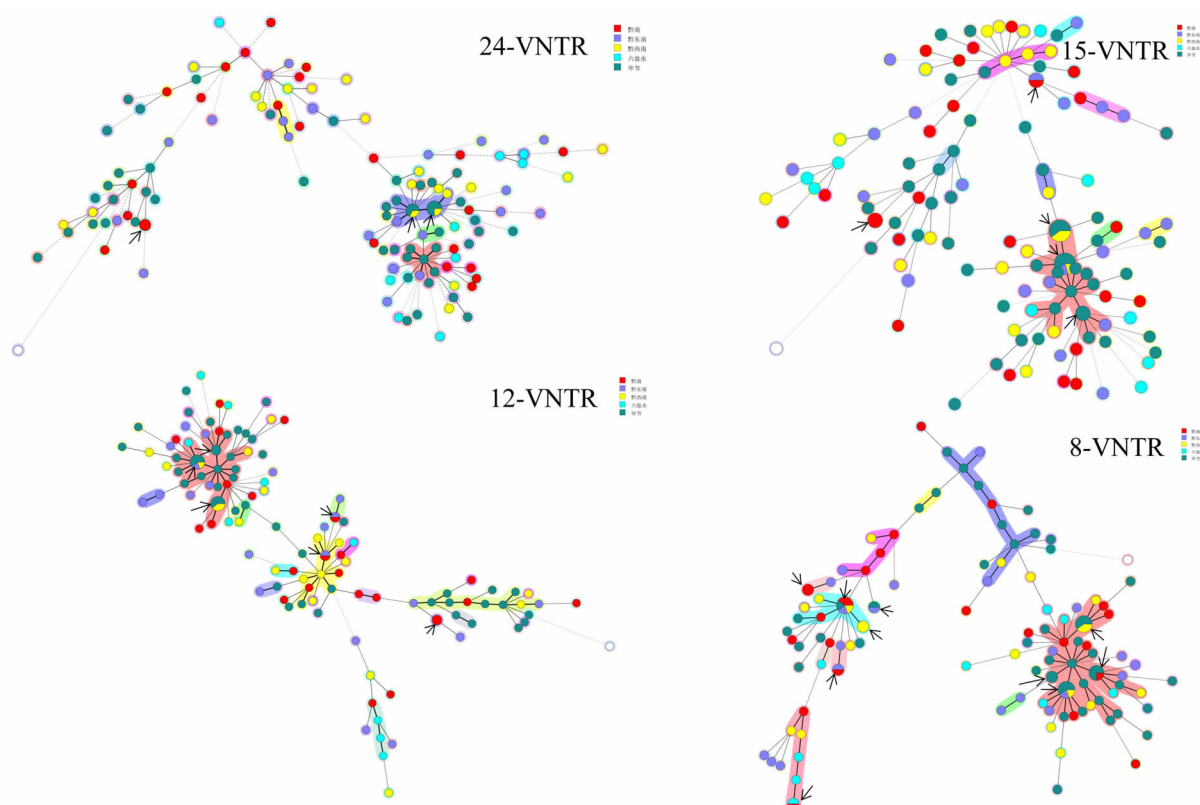


图 2 124 株结核分枝杆菌 4 种 VNTR 基因座模型聚类分析各基因群的菌株组成特征

Figure 2 The composition characteristics of strains after cluster tree analysis in 4 VNTR loci model for 124 MTB strains

24-VNTR 将 124 株结核分枝杆菌分成 118 个基因型,其中在 24-I 群形成 2 个簇,在 24-IV 群形成 1 个簇;15-VNTR 将 124 株结核分枝杆菌分成 113 个基因型,其中在 15-I 群形成 1 个簇,在 15-II 群形成



注:黑色小箭头所指的为成簇的相同基因型菌株。

Note: The small black arrows indicate clusters of strains in the same genotype

图 3 124 株结核分枝杆菌不同 VNTR 基因座的 MLVA 分型最小间距图

Figure 3 The minimum spanning tree in different VNTR loci model for 124 MTB strains

核分枝杆菌菌株进行 MLVA 分析, 但该研究并未通过多基因座的筛选, 不足够反映贵州省结核分枝杆菌菌株基因座的特征; 然而本研究通过多基因座等位基因多态性(h)和基因座分辨指数(HDGI)分析, 筛选分辨力更高的基因座组成不同的分析模型, 更具优势。国内只有少数研究通过对多 VNTR 基因座筛选、优化最后形成具有地区特征的 MLVA 分型模型<sup>[19-21]</sup>, 其中陈海霞、李卫民教授等人使用 2007 年全国耐药基线调查的结核分枝杆菌, 通过对菌株 15 个 VNTR 基因座的筛选, 为各省列出 12-VNTR、10-VNTR、8-VNTR、5-VNTR 的分析模型, 其中包括了贵州省, 并以贵州的两个耐药检测点(七星关区和西秀区)的菌株为代表<sup>[21]</sup>。本研究与该研究相比较, 使用了 2021 年的菌株进行模型的建立, 更接近于当前流行菌株的特征, 此外本研究使用的菌株来源于贵州省大部分地区(涵盖贵州 5 个市州), 更能代表贵州结核分枝杆菌的特征。在贵州不同 VNTR 基因座分析中, 李卫民教授等人共计筛选出 6 个高分辨力基因座, 本研究筛选出 7 个高分辨基因座, 其中有 5 个基因座与该研究一致, 但分辨力排名有所变化, 且有 1 个基因座变为了中等分辨力; 进一步对比发现中等分辨力基因座的排名也有所变化, 其原因可能是当前菌株遗传特征漂变的结果。本研究在此前研究的基础上, 所使用的菌株

来源及采集时间更能反映贵州省当前结核分枝杆菌的遗传特征, 并对更多基因座进行分辨能力的筛选, 并通过分辨力的排序旨在构建更合理的 MLVA 分析模型。

贵州省是结核病的高发省份, 也是结核病疫情高风险地区, 持续的分子遗传特征分析也是结核病监测的重要手段, 筛选适合贵州省 VNTR 基因座的 MLVA 分型对贵州省结核病疫情防控、传染源的追踪溯源、传播和遗传学研究至关重要。本研究通过国际通用的 24 个 VNTR 基因座在贵州结核分枝杆菌的应用研究, 初步阐明了适合当前贵州 MLVA 分型的 VNTR 基因座, 为贵州省结核病相关研究提供数据支持。此外, 本研究为了提高 15-VNTR、12-VNTR、8-VNTR 分型模型的分辨力, 应用 BIONUMERICS 8.0 软件对 15-VNTR+1、12-VNTR+1、8-VNTR+1 及 8-VNTR+2 分型模型进行了测试, 其分辨力分别为 91.94% (114/124)、91.13% (113/124)、87.10% (108/124) 和 88.71% (110/124)。通过与构建的 15-VNTR (91.13%)、12-VNTR (90.32%)、8-VNTR (83.06%) 相比, 虽然 8-VNTR+1 (87.10%) 及 8-VNTR+2 (88.71%) 分型模型分辨能力明显提高了, 但结合我省的实际情况, 综合分析成本、分辨力等因素我们推荐使用 12-VNTR (90.32%) 或者 12-VNTR+1 (91.13%) 模型

进行结核分枝杆菌分型工作开展, 该模型与 15-VNTR (91.13%) 模型的分型能力相近或者相等 ( $P>0.05$ ), 比 24-VNTR (95.16%) 分型模型节约了一半左右的成本, 且分辨能力无统计学差异 ( $P>0.05$ )。本研究还结合了毛细管电泳分析及荧光标记引物法, 很大程度的简化了结核分枝杆菌 MLVA 分型的操作步骤, 缩短了实验时间。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

## 参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2023[EB/OL]. [2024-11-15]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>.
- [2] 邓云峰. 分枝杆菌基因分型技术在结核病监测中的应用价值[D]. 济南: 山东大学, 2007.  
Deng YF. Application of mycobacterium tuberculosis genotyping method in molecular epidemiological surveillance study [D]. Jinan: Shandong Univ., 2007.(In Chinese)
- [3] 刘毅, 程君, 李传友. 结核分枝杆菌基因分型的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(5): 375-377.  
Liu Y, Cheng J, Li CY. Advances in the genotyping of mycobacterium tuberculosis [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2013, 36(5): 375-377.(In Chinese)
- [4] 张志, 罗保斌, 刘东艳, 等. 结核分枝杆菌基因分型技术研究进展[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2016, 32(6): 58-60.  
Zhang Z, Luo BB, Liu DY, et al. Research progress on genotyping techniques of mycobacterium tuberculosis[J]. Journal of Hebei North University(Natural Science Edition), 2016, 32(6): 58-60.(In Chinese)
- [5] 张子龙, 田桢干, 李深伟, 等. 一种基于二代测序技术用于结核分枝杆菌 MLST 分型的引物组及建库方法[EB/OL]. [2024-12-05]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=QnUIp1GSfy7YOABKxWM5yQli3OYbAXRDHV2blL9bJ5nAE7K32kKUBs0ySu1fL26g7y15Wk\\_NOC9TFy7XK--FQV0y8Haua9-k2M9TCkIhpwLiWV-2w8-ds250ULgforP2NG7wFihU53lRtCshZgwL3CpGLCwNeC6\\_bKF2ai7Eo-303ltsQkhgrF\\_mFS\\_V0zS4wQGvP2MgM=&uniplatform=NZKPT](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=QnUIp1GSfy7YOABKxWM5yQli3OYbAXRDHV2blL9bJ5nAE7K32kKUBs0ySu1fL26g7y15Wk_NOC9TFy7XK--FQV0y8Haua9-k2M9TCkIhpwLiWV-2w8-ds250ULgforP2NG7wFihU53lRtCshZgwL3CpGLCwNeC6_bKF2ai7Eo-303ltsQkhgrF_mFS_V0zS4wQGvP2MgM=&uniplatform=NZKPT).  
Zhang ZL, Tian ZG, Li SW, et al. A primer set and library construction method for mycobacterium tuberculosis MLST typing based on next-generation sequencing technology [EB/OL]. [2024-12-05]. [https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=QnUIp1GSfy7YOABKxWM5yQli3OYbAXRDHV2blL9bJ5nAE7K32kKUBs0ySu1fL26g7y15Wk\\_NOC9TFy7XK--FQV0y8Haua9-k2M9TCkIhpwLiWV-2w8-ds250ULgforP2NG7wFihU53lRtCshZgwL3CpGLCwNeC6\\_bKF2ai7Eo-303ltsQkhgrF\\_mFS\\_V0zS4wQGvP2MgM=&uniplatform=NZKPT](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=QnUIp1GSfy7YOABKxWM5yQli3OYbAXRDHV2blL9bJ5nAE7K32kKUBs0ySu1fL26g7y15Wk_NOC9TFy7XK--FQV0y8Haua9-k2M9TCkIhpwLiWV-2w8-ds250ULgforP2NG7wFihU53lRtCshZgwL3CpGLCwNeC6_bKF2ai7Eo-303ltsQkhgrF_mFS_V0zS4wQGvP2MgM=&uniplatform=NZKPT).(In Chinese).
- [6] 凌曦, 王璐, 张泽文, 等. 全基因组测序技术在结核病分子流行病学中的应用进展 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(4): 399-403.  
Ling X, Wang L, Zhang ZW, et al. Advances in the application of whole genome sequencing technique in molecular epidemiology of tuberculosis [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2022, 21(4): 399-403.(In Chinese)
- [7] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.  
Zhao YL, Pang Y. Laboratory testing procedures for tuberculosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015.(In Chinese)
- [8] 张思潮, 董正全, 杨中荣. VNTR 基因座对结核分枝杆菌基因分型的研究[J]. 浙江预防医学, 2014, 26(3): 221-223.  
Zhang SC, Dong ZQ, Yang ZR. A study on genotyping of mycobacterium tuberculosis by variable number tandem repeat analysis method [J]. Zhejiang Journal of Preventive Medicine, 2014, 26(3): 221-223.(In Chinese)
- [9] 陈旭, 刘英, 袁薇, 等. 贵州省部分地区结核分枝杆菌 MLVA 基因分型研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(1): 10-15.  
Chen X, Liu Y, Yuan W, et al. Genotyping of mycobacterium tuberculosis in Guizhou province using MLVA method [J]. Journal of Parasitic Biology, 2020, 15(1): 10-15.(In Chinese)
- [10] 刘毅, 程君, 李传友. 结核病分子流行病学研究方法进展和探讨[J]. 国际呼吸杂志, 2013, 33(14): 1078-1082.  
Liu Y, Cheng J, Li CY. Progress and discussion in molecular epidemiology of tuberculosis[J]. International Journal of Respiration, 2013, 33(14): 1078-1082.(In Chinese)
- [11] 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(12): 4498-4510.
- [12] Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats[J]. Microbiology (Reading, England), 1998, 144 (Pt 5): 1189-1196.
- [13] Skuce RA, McCorry TP, McCarroll JF, et al. Discrimination of mycobacterium tuberculosis complex bacteria using novel VNTR-PCR targets[J]. Microbiology (Reading, England), 2002, 148 (Pt 2): 519-528.
- [14] 袁薇, 郑雯琳, 何显颖, 等. 我国西部贵州地区结核分枝杆菌分子流行病学初步研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(1): 19-21, 34.  
Yuan W, Zheng WL, He YY, et al. Preliminary study on the molecular epidemiology of mycobacterium tuberculosis strains from Guizhou in Western China [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2017, 21(1): 19-21, 34.(In Chinese)
- [15] 张秀芝, 徐伟, 张爱洁, 等. 北京某中学耐药肺结核暴发疫情分子流行病学分析[J]. 中国学校卫生, 2020, 41(8): 1247-1249.  
Zhang XZ, Xu W, Zhang AJ, et al. Molecular Epidemiological Analysis of a Multidrug-Resistant Tuberculosis Outbreak in a Secondary School in Beijing [J]. Chinese Journal of School Health, 2020, 41(8): 1247-1249.(In Chinese)
- [16] 同重湘, 赵秀琴, 马建军, 等. 228 株结核分枝杆菌 MLVA 分型研究[J]. 中国医药导报, 2010, 7(16): 97-98.  
Tong CX, Zhao XQ, Ma JJ, et al. Analysis on the 228 mycobacterium tuberculosis with MLVA [J]. China Medical Herald, 2010, 7(16): 97-98.(In Chinese)
- [17] 龚新记. MLVA 用于新疆结核分枝杆菌基因分型的初步研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.  
Gong XJ. MLVA for genotyping of mycobacterium tuberculosis in Xinjiang [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2018. (In Chinese).
- [18] 谭云洪, 赵秀芹, 刘志广, 等. 湖南省 231 株结核分枝杆菌 (下转第 546 页)

- 870-875.  
Wang XY, Wu HC, Lu QB, et al. Analysis of public health emergencies and related information in schools of Zhejiang Province from 2012 to 2021 [J]. *Journal of Preventive Medicine*, 2022, 34(9): 870-875.(In Chinese)
- [13] 张庆锋,刘懿卿. 2015-2022 年辽宁省学校突发公共卫生事件流行特征分析[J]. *中国公共卫生管理*, 2023, 39(6): 842-845.  
Zhang QF, Liu YQ. Analysis of epidemiological characteristics of school public health emergencies in Liaoning Province from 2015 to 2022[J]. *Chinese Journal of Public Health Management*, 2023, 39(6): 842-845.(In Chinese)
- [14] 王旭,梁丽. 徐州市 2013-2022 年学校突发公共卫生事件流行病学特征分析[J]. *安徽预防医学杂志*, 2023, 29(6): 468-471, 476.  
Wang X, Liang L. Analysis on epidemiological characteristics of public health emergencies in schools in Xuzhou City from 2013 to 2022 [J]. *Anhui Journal of Preventive Medicine*, 2023, 29(6): 468-471, 476.(In Chinese)
- [15] 时慧. 高校面对突发公共卫生事件的应对方案[J]. *国际公关*, 2024, (6): 164-166.  
Shi H. Response programmes of universities to public health emergencies[J]. *PR Magazine*, 2024, (6): 164-166.(In Chinese)
- [16] 邬志薇,林燕,郑尔达,等. 2012-2022 年云南省边境地区突发公共卫生事件流行特征分析[J]. *现代预防医学*, 2024, 51(21): 4002-4007.  
Wu ZW, Lin Y, Zheng ED, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of public health emergencies in Yunnan Province's border areas(2012-2022)[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2024, 51(21): 4002-4007.(In Chinese)
- [17] 马晓江,周然,邹显东,等. 河北省 2011-2021 年突发公共卫生事件流行特征分析 [J]. *医学动物防制*, 2023, 39(12): 1172-1176, 1181.  
Ma XJ, Zhou R, Zou XD, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of public health emergencies in Hebei Province from 2011 to 2021 [J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2023, 39(12): 1172-1176, 1181.(In Chinese)
- [18] 李永盛,马斌忠,曹海兰,等. 2014-2018 年青海省突发公共卫生事件网络报告质量评价 [J]. *现代预防医学*, 2019, 46(22): 4133-4135, 4165.  
Li YS, Ma BZ, Cao HL, et al. Quality evaluation of the public health emergency Internet reporting in Qinghai province between 2014 and 2018 [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46(22): 4133-4135, 4165.(In Chinese)
- [19] 胡燕,王富兰,罗月英,等. 社区医务人员应对突发公共卫生事件的应急救援能力现状调查[J]. *卫生职业教育*, 2023, 41(24): 110-113.  
Hu Y, Wang FL, Luo YY, et al. Investigation on the status of emergency rescue ability of community medical personnel in response to public health emergencies [J]. *Health Vocational Education*, 2023, 41(24): 110-113.(In Chinese)
- [20] 杨晓忠. 突发公共卫生事件中医护人员职业安全防护对策——评《公共卫生突发事件中职业安全与健康:医护人员和应急救援者防护指南》[J]. *中国安全科学学报*, 2024, 34(3): 10004.  
Yang XZ. Countermeasures for occupational safety and health protection of healthcare workers in public health emergencies—a review of occupational safety and health in public health emergencies: guidelines for the protection of healthcare workers and emergency responders[J]. *China Safety Science Journal*, 2024, 34(3): 10004.(In Chinese)
- [21] 贺金,冯海哲,杨星,等. 贵州省市县两级疾控机构应急人员卫生应急能力自我认知调查及影响因素分析[J]. *现代预防医学*, 2023, 50(13): 2459-2464.  
He J, Feng HZ, Yang X, et al. Investigation on self-cognition of health emergency response ability of emergency personnel in Disease Control and Prevention institutions at city and county level in Guizhou Province and analysis of its influencing factors [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2023, 50(13): 2459-2464.(In Chinese)

收稿日期: 2024-07-22

## (上接第 532 页)

- Spoligotyping 和 MLVA 基因分型方法及其结果分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(10): 947-948.  
Tan YH, Zhao XQ, Liu ZG, et al. Analysis of spoligotyping and MLVA genotyping methods and results for 231 strains of mycobacterium tuberculosis in Hunan province [J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2010, 44(10): 947-948.(In Chinese)
- [19] 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.  
Li M, Jiao WW, Sun GZ, et al. Genotyping of Beijing genotype strains isolated from Beijing area by different combinations of variable-number tandem-repeat loci [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2008, 24(6): 505-509.(In Chinese)
- [20] Luo T, Yang CG, Pang Y, et al. Development of a hierarchical variable-number tandem repeat typing scheme for Mycobacterium tuberculosis in China[J]. *PLOS One*, 2014, 9(2): e89726.
- [21] 陈海霞,蔡超,刘静仪,等. 不同可变数目串联重复序列组合对中国流行结核分枝杆菌分力的评价研究[J]. *结核病与胸部肿瘤*, 2017, 38(3): 173-178.  
Chen HX, Cai C, Liu JY, et al. Discriminatory power of variable number on tandem repeats loci for genotyping mycobacterium tuberculosis strains in China [J]. *Tuberculosis and Thoracic Tumor*, 2017, 38(3): 173-178.(In Chinese)

收稿日期: 2024-09-20