

MPT 抗原阴性的结核分枝杆菌复合群 临床分离株 *mpt64* 突变特征分析

易松林, 郭婧玮, 陈忠南, 胡培磊, 刘彬彬, 刘昭国, 龙海波, 谭云洪
湖南省胸科医院, 湖南 长沙 410013

摘要: **目的** 分析 MPT 抗原阴性的结核分枝杆菌复合群临床分离株 *mpt64* 突变特征。 **方法** 收集湖南省胸科医院 2017 年 1—6 月 BACTEC MGIT 960 法 (MGIT 960) 培养分离的菌株, 通过生化和分子生物学方法进行菌种鉴定, 然后将结核分枝杆菌复合群随机抽取部分 MPT 抗原阳性株及全部 MPT 抗原阴性菌株进行 DNA 提取、*mpt64* 基因扩增测序和序列比对, 并对结核分枝杆菌复合群 MPT 抗原呈阴性的临床分离株 *mpt64* 突变特征进行分析。 **结果** 2017 年 1—6 月湖南省胸科医院就诊的结核患者的痰液或支气管肺泡灌洗液等标本共分离出 2 560 株结核分枝杆菌, 其中 MPT 抗原检测阳性有 2 458 株, MPT 抗原检测阴性有 102 株, MPT 抗原阴性占比 3.98% (102/2 560)。随机抽取的 20 株 MPT 抗原阳性株的 *mpt64* 基因无突变。测序成功的 85 株 MPT 抗原阴性的临床分离株中, 有 81 株 *mpt64* 基因存在 63 bp 碱基的缺失突变, 有 4 株存在单碱基突变, 2 株 402 位 G→A, 2 株 613 和 614 位间加了碱基 C。 **结论** 湖南省胸科医院 MPT 抗原呈阴性的结核分枝杆菌复合群临床分离株 *mpt64* 基因突变主要类型为 63bp 碱基的缺失。

关键词: 结核分枝杆菌复合群; MPT64; 缺失突变

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2020)06-0649-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.06.003

Characteristics of *mpt64* gene mutation of MPT64-negative clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex

YI Song-lin, GUO Jing-wei, CHEN Zhong-nan, HU Pei-lei, LIU Bin-bin, LIU Zhao-guo, LONG Hai-bo, TAN Yun-hong
Hunan Chest Hospital, Changsha, Hunan 410013, China

Author contributions: YI Song-lin and GUO Jing-wei contributed equally to this paper

Corresponding author: TAN Yun-hong, E-mail: 1220163360@qq.com

Abstract: **Objective** To explore the characteristics of *mpt64* gene mutation of MPT64-negative clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). **Methods** MTC clinical isolates cultured by BACTEC MGIT 960 in Hunan Chest Hospital from January and June in 2017 were collected. All the isolates were identified by biochemical and molecular biological methods. DNA extraction, *mpt64* gene amplification sequencing and sequence alignment analysis were performed in some MPT64-positive isolates and all MPT64-negative isolates randomly selected from MTC, and the characteristics of *mpt64* gene mutation of MPT64-negative clinical isolates of MTC analyzed. **Results** A total of 2,560 *Mycobacterium tuberculosis* isolates were recovered from sputa, bronchoalveolar lavage fluid or other samples from tuberculosis patients hospitalized in Hunan Chest Hospital from January to June in 2017. Among the 2,560 isolates, 102 (3.98%) isolates were MPT64-negative. No mutation was found in *mpt64* gene in 20 randomly selected MPT64-positive isolates. Among 85 successfully sequenced MPT64-negative clinical isolates, 81 isolates had a 63-bp deletion, and 4 isolates had a single base mutation, including 2 isolates with G→A at 402 and 2 isolates with a 1-bp (C) insertion between 613 and 614. **Conclusion** The 63-bp deletion was the dominant mutation type for *mpt64* gene in MPT64-negative clinical isolates of MTC in Hunan Chest Hospital.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex; MPT64; deletion mutation

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的一种严重危害群众健康的慢

基金项目: 湖南省卫生计生委科研计划课题项目 (C2016034)

作者简介: 易松林 (1965-), 男, 湖南长沙人, 本科, 副主任技师, 主要从事结核病实验室工作。郭婧玮为本文并列第一作者。

通信作者: 谭云洪, E-mail: 1220163360@qq.com。

性传染病。据 WHO 的 2018 年全球结核病报告, 2015 年全球共有 1 040 万新发现结核病患者, 印度、印度尼西亚、中国、尼日利亚、巴基斯坦和南非六个国家占到 60%^[1], 情况不容乐观。我国作为结核病高负担国家之一, 患病人数基数大, 结核病的流行形势严峻。

准确且快速的诊断方法在结核病确诊及疗效评估

中有着至关重要的作用,而传统的诊断方法仍旧有一定的局限性。基于以往研究发现^[2-5],结核分枝杆菌生长早期可以分泌至少33种不同的分泌蛋白,其中包括MPT64。MPT64最初分离于卡介苗培养物过滤液中,目前仅发现于结核分枝杆菌复合群中(包括牛分枝杆菌卡介苗的次代菌株的液体培养物)。MPT64可用于临床诊断^[6],文献报道^[7],MPT64作为靶标用于诊断结核病的敏感性要远远大于IS6110。Therese等^[8]的研究表明,MPT64是可靠且高特异度的靶分子,可用于临床标本中结核分枝杆菌的诊断。

以MPT64作为抗原的结核分枝杆菌检测方法,在南非、泰国和赞比亚的临床验证中表现出很高的诊断效能^[9-11]。尽管如此,临床上仍会有极小一部分的结核分枝杆菌复合群培养阳性,但MPT抗原检测为阴性。假阴性的产生可能是由于编码MPT64蛋白的基因*mpt64*发生突变,特别是对于BCG亚株^[12-13]。

本文拟对收集的所有MPT抗原检测呈阴性的结核分枝杆菌临床菌株进行*mpt64*测序,分析其突变特征,为临床工作中结核分枝杆菌的鉴别和结核病的快速诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株 结核分枝杆菌标准菌株H37Rv来源于中国疾病预防控制中心国家结核病参比实验室,其余菌株分离于2017年1—6月湖南省胸科医院就诊的结核患者的痰液或支气管肺泡灌洗液等标本。

1.2 试剂 BBLTMMGITM微生物生长指示管和MGITM960营养添加剂购自美国BD公司,MPT抗原检测试剂盒购自杭州创新生物检控技术有限公司,三种罗氏鉴别培养基购自珠海贝索公司。

1.3 临床菌株的分离与鉴定 痰液或支气管肺泡灌洗液等临床标本通过MGIT 960法培养分离,并经中性罗氏培养基、噻吩-2-羧酸胍培养基和对硝基苯甲酸培养基鉴别法,以及分子生物学方法相结合鉴定为结核分枝杆菌复合群。

1.4 DNA的提取 采用超声波裂解法,取灭菌EP管,加入300 μl去离子水,从罗氏培养基斜面上刮取适量菌株分别放入管内。将装有菌株的EP管放在金属浴上85℃灭活20 min,12 000 r/min离心5 min,弃上清,每管加500 μl无菌蒸馏水重悬沉淀,12 000 r/min离心5 min,弃上清,每管加入100 μl无菌蒸馏水,95℃金属加热20 min,然后超声裂解15 min。最后12 000 r/min离心5 min,上清即为待测序的DNA样本。

1.5 *mpt64*基因测序及序列分析 提取的DNA样本送至北京睿博兴科生物科技有限公司进行扩增、测序和双相拼接。测序引物为:primer1:5-ATCGACTAT-GCGCAGACTT和primer2:5-AGCAGGGAATC-CTCTAACGC。通过与结核分枝杆菌H37Rv(NC000962.3)的*mpt64*进行在线BLAST序列比对,分析结核分枝杆菌临床分离株*mpt64*的突变特征。

2 结果

2.1 MPT抗原检测 湖南省胸科医院2017年1—6月就诊的结核患者的痰液或支气管肺泡灌洗液等标本中,MGIT 960法培养分离出2 560株结核分枝杆菌,其中MPT抗原检测阳性有2 458株,MPT抗原检测阴性有102株(MPT抗原初次检测阴性,经延长培养时间再次检测认为阴性),在结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)中占比3.98%(102/2 560)。

2.2 MPT抗原阴性菌株*mpt64*序列分析 测序102株MTC中,成功提取DNA并扩增测序的仅85例,另随机取MPT抗原阳性菌株20例菌株进行扩增测序,*mpt64*基因扩增片段为1 300 bp。其中,20例MPT抗原阳性菌株的*mpt64*基因无缺失无突变。而85株MPT抗原阴性的临床分离株中,有81株*mpt64*基因存在63 bp碱基的缺失突变,4株存在单碱基突变,其中2株402位碱基G→A,2株613和614位间插入碱基C。见表1。

表1 105株MTB基因序列结果分析

| 分类 | 63bp 基因片段缺失 | 单碱基突变 | 无突变 | 合计 |
|----------|-------------|-------|-----|-----|
| MPT抗原阴性株 | 81 | 4 | 0 | 85 |
| MPT抗原阳性株 | 0 | 0 | 20 | 20 |
| 合计 | 81 | 4 | 20 | 105 |

3 讨论

结核病是一种严重危害群众健康的慢性传染病,其病原菌为MTB,其常用的培养方法有解良罗氏法(Lowenstein-Jenden, L-J)等固体培养方法和MGIT 960法等液体培养方法。目前,MPT抗原检测作为MTC一种鉴定方法而被广泛应用,其方法具有方便、快速、敏感性、特异性高的特点,然而,仍有一部分MTC菌株MPT抗原检测呈阴性。

有文献中表明,MPT抗原的检测灵敏度为92.4%~99.2%^[14-16]。而另有小部分MTC的MPT抗

原呈阴性的,这可能是由于培养基中细菌数量的减少或细菌的 *mpt64* 基因突变造成的,从而使得它们难以识别^[16],亦或是某些分离株中 MPT 抗原的低表达导致假阴性的存在^[17]。

本研究发现, MGIT 960 法培养分离的 MTC 中, MPT 抗原检测阴性有 102 例,占比 3.98% (102/2 560)。对 MPT 抗原检测初次阴性的 MTC 菌株经延长培养时间再次检测 MPT 抗原,未发现有 MPT 抗原复阳的菌株,说明本研究中 MPT 抗原阴性与 MTC 菌量无关。MPT64 检测阴性的 MTC 分离株经测序分析,在 *mpt64* 的 DNA 序列第 196~258 位缺失一段长 63 bp 的核酸片段,缺失突变的占 95.29% (81/85),这与大部分已报道的文献相契合^[13,18]。Hirano 等^[15] 的实验中发现有 2 株 MPT 抗原阴性的 MTB 在 *mpt64* 的 DNA 序列 402 位碱基 G→A。而本实验中,单碱基突变的仅占 4.71% (4/85),包括碱基插入和碱基替换两种突变类型,2 株 402 位碱基 G→A 与已报道的文献相同,但暂未查阅到相关文献报道 613 和 614 位间插入碱基 C,这需要进一步研究和证实。在 MPT 抗原阳性的菌株中,未发现以上的基因突变情况,也有研究发现某些 MPT 抗原阳性的 *mpt64* 基因存在无义的点突变^[19],但这是否存在地区差异性,以及在耐药菌中是否存在差异^[20],都有待进一步探讨和研究。

综上所述,湖南省胸科医院临床分离的 MTC 中, MPT 抗原检测阴性的临床分离株 *mpt64* 基因主要突变类型为 63 bp 的缺失突变,其余是碱基插入和碱基替换。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. (2018-9-26) [2019-08-10]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

[2] 孙雪娟, 陈忠秀, 胡旭, 等. MPB64 特异性抗原检测在结核病临床快速诊断中的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(12): 2094-2095.

[3] Hirano K, Aono A, Takahashi M, et al. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1):390-392.

[4] 潘爱珍, 吴蓓蓓, 柳正卫, 等. MPB64 免疫胶体金检测法在分枝杆菌菌株鉴定中的应用[J]. 浙江预防医学, 2015, 27(7):691-694.

[5] 尹小毛, 谢贝, 罗春明, 等. 应用 *mpt64* 检测建立结核分枝杆菌药敏新方法的初步探索[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(4): 371-372.

[6] Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, et al. Detection of active tuberculosis by an MPB64 transdermal patch: a field study[J]. Scand J Infect Dis, 2001, 33(6):405-407.

[7] Sharma K, Ashkin D, Fiorella P, et al. Evaluation of multiplex poly-

merase chain reaction utilising multiple targets in *Mycobacterium tuberculosis* direct test negative but culture positive cases: a potential method for enhancing the diagnosis of tuberculosis[J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31(4):370-373.

[8] Therese KL, Gayathri R, Dhanurekha L, et al. Diagnostic appraisal of simultaneous application of two nested PCRs targeting MPB64 gene and IS6110 region for rapid detection of *M. tuberculosis* genome in culture proven clinical specimens[J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31(4): 366-369.

[9] Shen GH, Chiou CS, Hu ST, et al. Rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by combining the ESAT-6/CFP-10 immunochromatographic assay and smear morphology[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):902-907.

[10] Muyoyeta M, de Haas PE, Mueller DH, et al. Evaluation of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* infections in Zambia and South Africa[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10):3773-3775.

[11] Muchwa C, Akol J, Etwom A, et al. Evaluation of Capilia TB assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in BACTEC MGIT 960 and BACTEC 9120 blood cultures[J]. BMC Research Notes, 2012, 5(44):1-6.

[12] Gaillard T, Fabre M, Martinaud C, et al. Assessment of the SD bioline Ag *mpt64* rapid and the MGIT Tbc identification tests for the diagnosis of tuberculosis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 154-156.

[13] Yu MC, Chen HY, Wu MH, et al. Evaluation of the rapid MGIT Tbc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3):802-807.

[14] Ngamlert K, Sinthuwattanawibool C, McCarthy KD, et al. Diagnostic performance and costs of Capilia TB for *Mycobacterium tuberculosis* complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand [J]. Trop Med Int Health, 2009, 14(7):748-753.

[15] Hirano K, Aono A, Takahashi M, et al. Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB-negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1):390-392.

[16] Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2005, 9(12):1409-1411.

[17] Park MY, Kim YJ, Hwang SH, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(2): 481-484.

[18] Qiu Y, Wan L, Li H, et al. Impact of 63-bp deletion and single-base mutation in *mpt64* gene on *M. tb* diagnosis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(3):3210-3214.

[19] 仇艳, 蒋毅, 刘海灿, 等. 中国结核分枝杆菌 MPT64 蛋白多态性及对 MPT64 抗原检测试剂盒的敏感性影响[J]. 实用预防医学, 2015, 22(4):385-389.

[20] 胡彦, 刘洁, 杨春. 结核分枝杆菌二线抗结核药物耐药分子机制研究进展 [J]. 实用预防医学, 2017, 24(11):1405-1409.