

るシステムに発展させることも可能となる。

2. 台湾 CDC との共同研究

平成 21 年 2 月 21 日台湾疾病予防センター抗酸菌部部長の Dr. Ruwen Jou らと研究会議を持ち、情報交換を行った(資料 9)。

C. 研究結果

VNTR分析では、ローカスの選択が非常に重要で、どの locus を何箇所、解析するかで本型別法の分解能は大きく左右される。米国疾病予防管理センターでは、Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) の 12 箇所、ヨーロッパ諸国ではフランスパスツール研究所の Supply らが報告した Supply (15)-あるいは Supply (24)-VNTRシステムが、新しい結核菌の型別法として採用されている。ヨーロッパ諸国では、この Supply(15)-VNTRを用いて結核菌の型別情報のデータベース化が進められている。しかし、東アジア諸国では、米国、ヨーロッパ諸国と広まっている結核菌の遺伝子型が異なり、北京型結核菌が結核全体の7-8割を占めている。日本国内の結核菌をMIRU(12)およびSupply(15)-VNTRで分析すると大きなクラスターが形成し、これらのVNTR分析システムでは、北京型結核菌に対する分解能が低いことが判明している。そのため、北京型結核菌を効率良く型別できるVNTRシステムを構築する必要がある。

このような分析システムのひとつの候補として日本全国から集めた結核菌を分析して結核研究所が報告した JATA(12)-VNTR法がある。この方法が直接適用できるか、まずは中国、韓国、日本で広がっている結核菌の遺伝子型を比較した。

日本株と韓国株との比較:北京型結核菌は、NTF領域にIS6110が挿入されている“Modern型”と挿入されていない“Ancient型”の2つに大きく区分される。中国(北京)、香港、ベトナム、ロシアおよびヨーロッパ諸国ではModern型が75-95%を占めているのに対して、日本では75-80%がAncient型であり、日本の結核菌は諸外国で広まっている北京型株と異なることが判明している。一方、韓国国内で分離された80株を使ってAncient型とModern型の割合を調べたところ、日本の結核菌と同様に72%がAncient型であった(表1)。また、NTF領域にIS6110が挿入される前に生じるRD181領域欠損という事象が生じていないRD181領域陽性株は、東京都内で分離された株では87株のAncient株中17株(20%)であるのに対して韓国国内で分離された株では46株のAncient株中29株(63%)とその割合が高いことが判明した(表2)。

日本株と中国(上海)株との比較:VNTR 4120は、日本国内株の分析では高頻度変化部位(HV)で北京型結核菌に対するHunter-Gaston discriminatory index (HGI)は、0.902と高い値であった。しかし、上海で分離された株のHGIは、0.092と非常に低かった。このように、同じ

表1. 大阪、東京、韓国で分離された北京型結核菌

	Total numbers	Number of isolates	
		Ancient	Modern
Osaka	175	130 (75%)	45 (25%)
Tokyo	113	87 (77%)	26 (23%)
Korea	64	46 (72%)	18 (28%)

表2. Ancient型結核菌のRD181部位の有無

	No. of Ancient isolates	RD181	
		Positive	Negative
Osaka	130	15 (12%)	115 (88%)
Tokyo	87	17 (20%)	70 (80%)
Korea	46	29 (63%)	17 (37%)

北京型結核菌であってもコピー数の変化頻度は、日本と上海では大きく異なることが明らかになった。

台湾における分子疫学研究:台湾CDCは全国で分離される結核菌の約50%の菌株を収集しており、収集した全菌株に対してRFLP及びVNTR (12-MIRU+3ETR)を実施して、データベース化されている。

これらの菌の中で北京株は44.4%と日本、韓国、中国本土よりも低い割合であるが、北部、東部では北京型が多く、過去数十年間に優勢になっており、起こっている感染の原因となっていると考えられる。これらデータを用いてMST解析も可能であり、解析ソフトを入手して実施することになった。

今後の研究計画

次年度は、それぞれの国で広まっている結核菌の遺伝的背景を解析し、違いを明らかにするために以下の内容で解析を進める。

- (1) 結核研究所は必要な試薬等を送付し、また技術援助を行う。
- (2) 分析に利用する結核菌の選択は、ある地域内で一定期間内に分離したすべての株を分析し、株の選択の時点でバイアスがかからないようにする。
- (3) VNTR解析の精度管理: コピー数の定義は、日本で使っている共通なものを利用し、お互いに結核菌DNAを送り同じ結果が得られるようにする(但し、中国からのDNA検体の輸出は政府の許可が必要で難しい)。
- (4) 役割分担をはっきりさせ、期日を設定してそれまでにそれぞれの施設毎にデータを出す。
- (5) 各国のデータに基づきminimum spanning tree

(MST)解析を行い各国で広がっている結核菌株の違い等を明らかにし、共同で学術論文を作成する。

また、台湾 CDC も次年度より本研究に参加することで基本的に合意した。

D. 考察

東アジアの国で広がっている北京型結核菌は、遺伝的背景が異なる株がそれぞれの国で広がっていることが判明した。中国（北京や上海）株は、Modern 型の割合が高く、また VNTR 4120 の例のように HGI が日本のものと大きく異なることがわかった。このような北京型株（Modern 型）は、最近ヨーロッパ、南アフリカおよびロシアで広がっている北京型結核菌と同じと考えられるため、Supply(15)-VNTR で型別できる可能性もある。他方、韓国で広がっている結核菌は、日本の株と非常に似ていて Ancient 型が高い割合で検出された。しかし、Ancient 型でも RD181 欠損が起こっていない RD181 陽性株の割合が日本国内で分離された株より高いことが判明した。次年度、それぞれの国から分離された結核菌を用いて minimum spanning tree (MST)解析を行う予定である。このような解析から各国で広がっている結核菌の遺伝的背景が異なるということを客観的に示すことができる。また、MST 解析により、各国の結核菌を共通に区別できる適切な loci を選択すれば、本研究の目的である東アジアで共通に利用できるコアとなる VNTR システムの構築が可能となる。同時に日本国内株と、韓国あるいは中国由来の株等を高い確率で判別できる loci 等も明らかにすることができると考えられる。

E. 結論

近年、人の移動が活発になり、感染症が流入する可能性が高まっている。共通の方法で結核菌の型別を行いデータベース化することにより、近隣諸国で問題となっている病原性の高い結核菌（スーパープレクター）や多剤耐性結核菌などの遺伝子型情報を共有することが可能となり、このような高病原性結核菌の流入を早期に把握するためのシステムの確立が可能となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshiro Murase, Satoshi Mitarai, Isamu Sugawara, Seiya Kato, Shinji Maeda : Promising loci of variable numbers of tandem repeats for typing Beijing family Mycobacterium tuberculosis.: J Med Microbiol., 57: 873-880, 2008

2. 前田伸司、村瀬良朗、御手洗聡、菅原勇、加藤誠也；

国内結核菌型別のための迅速・簡便な反復配列多型 (VNTR)分析システム -JATA (12) -VNTR 分析法の実際-、結核、83: 673-678, 2008

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Introduction

- It is one of the first-line drugs included in short-course anti-tuberculosis therapy in combination with isoniazid, rifampin, and pyrazinamide.
- EMB is only active against dividing mycobacteria, being bacteriostatic

Introduction

- EMB disrupts arabinogalactan synthesis by inhibiting the enzyme arabinosyl transferase.
- Disruption of the arabinogalactan leads to increased permeability of the cell wall.

The implication of *embB* gene polymorphism in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates.

2009. Jan. 20. RIT meeting

Youngkil Park
KIT

Introduction

- Ethambutol (EMB), a synthetic compound with structural similarity to D-arabinose, was first introduced in 1961.
- This drug is used to treat TB and other infections caused by such as *Mycobacterium kansasii*.

Material and Method

- ◆ The strains were selected randomly among strains isolated during from 2005 to 2007.
- ◆ All of them were isolated from primary pulmonary tuberculosis patients registered in public health center covered over south Korea.

Material and method

- ◆ We used 4 drugs - isoniazid, rifampicin, ethambutol, and streptomycin - with concentrations of 0.2 µg/M₂, 40 µg/M₂, 2 µg/M₂, and 10 µg/M₂ on the LJ media, respectively.
- ◆ We selected 77 pan-susceptible, 26 any drug resistant, non-MDR but EMB susceptible, 42 MDR but EMB susceptible, 91 EMB resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates.

Introduction

- ◆ Three contiguous *embCAB* genes encoding arabinosyl transferase were discovered in 1997 (Telenti et al).
- ◆ The mutation in the *embB* gene is considered to be associated with ethambutol (EMB) resistance.

Introduction

- ◆ Recently, the *embB* gene mutation is controversial because the mutation has also been found in ethambutol susceptible strains (2001,2002,2004,2007).
- ◆ This study aims to expand our understanding of EMB resistance in relation to *embB* gene mutation

Mutation codon	Pan- Susceptible (77)	Any R ₂ non-HDR, but EMB - susceptible (26)	MDR but EMB- susceptible (42)	EMB-resistant (91)
Met206Ile		ATG-ATC(1)	ATG-GTC(2)	ATC-ATC(5)
Met206Val		ATG-GTC(1)	ATC-GTC(2)	ATC-GTC(4)
Met206Ile			ATC-ATA(2)	ATC-ATD(9)
Met206Leu				ATC-AT(1)
Ile319Asp	TAT-GAT (1)		Ile319 Ser+TAT-TCT(2)	ATC-CTG(2)
Asp354Ala			GAC-GCC(1)	GAC-GCC(2)
Val200Val	GTC-GTA(1)¶			GAC-GCC(2)
Asn397Thr				AAC-ACC(2)
Gln482Asp			GAC-GAC(1)	GAG-GAC(1)¶
Gly-406Asp		GCC-GACC(2)	GCC-GACC(3)	GCC-GAC(2)¶
Gly-406Ala			GCC-GCC(2)	GCC-GCC(1)
Gly-406Ser			GCC-AACC(2)	
Gly-406Cys¶				GCC-GC-AT(1)¶
Gly-458Asp	GCC-GACC(1)			
Gln497Lys			CAG-AAG(1)	CAG-AAAG(2)
Gln497Pro			CAG-CCC(2)	
Gln497Arg			CAG-CGG(1)	CAG-CGG(10)
TOTAL	30.9%(212.6%)	4 (15.4%)	19 (45.2%)	82 (90.1%)/81 (89.0%)
none	74	22	23	9

PCR

- ◆ The primers were designed to become 800bp including ethambutol resistance-determining region(ERDR) of *embB* gene in *M. tuberculosis*.
- ◆ The sequence of forward primer was 5'-ggtgatctgcttct-3' and reverse primer was 5'-atagcgcggtgatcaaaag-3'.
- ◆ PCR was performed in a total volume of 50 µl with 1 U of Ex-Taq polymerase with annealing at 56 °C.

Pan-Susceptible

Mutation codon	This study Korea L-3 2ug/ml (77)	Tuberc Respi- Dis Kor2005. L-3 58: 129 (50)	JGM2007, 40: 3810 Russia L-3 (43)	Tuberculosis s 2007, Kuwait MGT1960 2.5ug/ml (25)
Ile319Asp	TAT-GAT(1)			
Val360Val¶	GTC-GTA(1)			
Gly-459Asp	GCC-GACC(1)			
TOTAL	2(2.6%) #isolant(1.3%)			
none	74	50	43	25

Sequencing

- ◆ We sequenced the PCR products with ABI 3730 XL.
- ◆ We confirmed 3 times with forward and reverse primers when the mutation type is rare.

Mutation codon	This study (9/1)	Tuberc Respiro Dis 2005, 58: 129 (44)	JCM2002,40:381 Russia (29) (only 306)	Tuberculosis 2007, 87:123 (50) (limited range)
Met306Leu	ATC-ATC(1), 6.5%	53 (35.0%)	Val (10) 34.5%	10 (20.0%)
Met306Val	ATC-GTC(1), 3.74%	28 (13.4%)	Ile (4) 13.5%	4 (8.0%)
Met306Ile	ATC-ATT(1), 1.1%			
Met306Leu 319	ATC-CTG(2), 2.1%	2 (1.2%)		1 (2.0%)
Asp346Ala	GAC-GCC(3), 2.2%			
Asp346Thr	AAC-ACC(1), 2.1%			
Gln353Arg	CAG-CAC(1), 1.1%			
Gln353Arg	GCC-GAC(1), 2.1%	3 (2.0%)		
Gln353Ile	GCC-GTC(1), 1.1%	1 (1.0%)		
Gly406Ser		GCC-AAC(1), 1.1%		2 (4.0%)
Gly406Gly	GCC-GCA(1)			
489				
Gln497Tyr	CAG-AAG(1), 1.2%	4 (2.7%)		1 (2.0%)
Gln497Arg	CAG-CGC(1), 1.0%	9 (6.0%)		2 (4.0%)
TOTAL	82 (60.1%) (1 double mutation) 1 silent mutation	106 (71.5%) 14 double mutation	14 (46.5%)	20 (40.0%)
none	9	49	15	30

Dese *embB* mutation confer

EMB resistance?

- Transfer of *embB* codon 306 mutation into clinical *M. tuberculosis* strains alters susceptibility to ethambutol, isoniazid, and rifampin. AAC 2008, 52:2027

- Depend on DST media? BACTEC460 system more sensitive? (JCM 2001, 39:636)

- Depend on mutation site? V492L, A680T, and A1007V were not associated with EMB resistance. (JCM 2007, 45:179)

Any R, non-MDR, EMB – susceptible

Mutation codon	This study (26)	JCM2002,40:3810 Russia (42) (Only 306)	Tuberculosis 2007, 87:123 Kuwait (64) (Only 306)
Met306Ile	ATG-ATC(1) 3.8%	Met-Ile (7) 16.7%	ATG-GTC(1)
Met306Val	ATG-GTC(1) 3.8%	Met-Val/Leu (1), 2.4%	1.6%
Gly406Asp	GCC-GAC(2) 7.7%		
TOTAL	4 (15.4%)	8 (19.0%)	1 (1.6%)
none	22	34	63

MDR but EMB- susceptible

Mutation codon	This study* (42)	JCM2002,40:3810 Russia (63) (only 306)	Tuberculosis 2007, 87:123 Kuwait (22) (only 306)
Met306Val	ATG-GTC(2) 4.8%	Val/Leu (23) 33.3%	2 (9.1%)
Met306Ile	ATG-ATC(2) 4.8%	Ile (17) 24.6%	
Ile319Ser	TAT-TCT(2) 4.8%		
Asp346Ala	GAC-GCC(1) 2.4%		
Gln405Asp	GAG-GAC(1) 2.4%		
Gly406Asp	GCC-GAC(3) 7.1%		
Gly406Ala	GCC-GCC(2) 4.8%		
Gly406Ser	GCC-AGC(2) 4.8%		
Gln497Lys	CAG-AAG(1) 2.4%		
Gln497Pro	CAG-CGC(2) 4.8%		
Gln497Arg	CAG-CGC(1) 2.4%		
TOTAL	19 (45.2%)	40 (63.0%)	2 (9.1%)
none	23	20	20

Arigadou gojaimas

Thank you very much.

Remanined experiments

- ◆ DST with various concentrations of EMB drug and
- ◆ DST with various media such as Middlebrook 7H11 agar media or MGIT960
- ◆ Compare IS6110 RFLP types or VNTR types of the tested strains.

Summary

- ◆ We found *embB* gene mutations among the pan-susceptible strains. However, these mutation sites (319, 459) may not confer EMB resistance.
- ◆ We found *embB* gene mutations among the EMB susceptible but any other drug-resistant strains.
- ◆ However, these mutation sites (306, 354, 399, 405, 406, 497) may confer EMB resistance.

Comparison of cluster groups analyzed in each genotyping method(2)



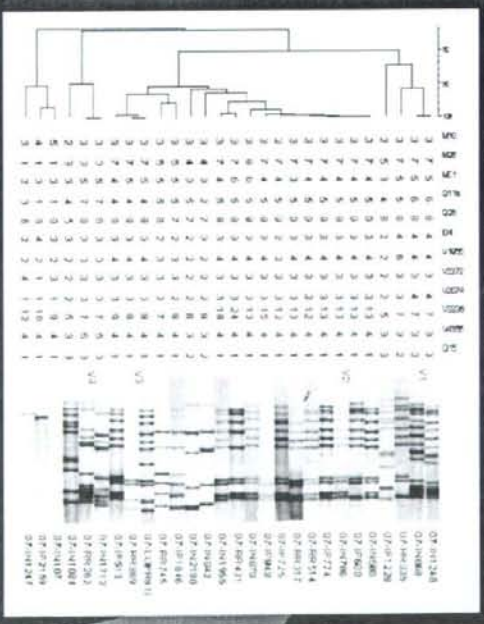
* K: Kanamycin resistance gene in MT
 R1-R11: cluster groups in RFLP method when position base pair setting is 5%
 R12-K: cluster groups in RFLP method when position base pair setting is 1%
 V1-V4: cluster groups in VNTR typing

Estimation of cluster R1 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR

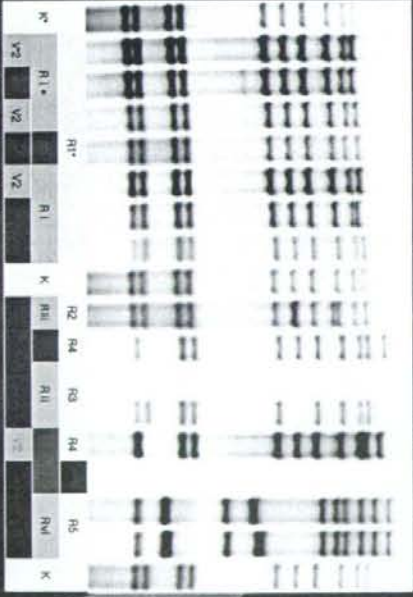
No.	STU System	QUT119	MDL103	VNTR155	VNTR272	VNTR624	MDL126	VNTR2074	VNTR336	VNTR4136	VNTR155	MDL138	VNTR4952
07-AB34	8	4	4	4	4	7	8	12	4	1	1	1	1
07-AB35	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB40	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB41	8	4	4	4	4	7	8	9	4	1	1	1	1
07-AB74	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB75	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB76	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB77	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB78	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB79	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1
07-AB7A	8	4	4	4	4	7	8	13	4	1	1	1	1

No.	BLVD	HTP	EM	ELMB	KM	CMV	PTH	CS	PAS	CFK	PZA	HBT	MOF
07-AB01A	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-AB105A	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-AB500	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-AB513	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-AB706	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-AB870	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-AB77A	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Genotyping results ordered by similarity on the basis of VNTR typing results

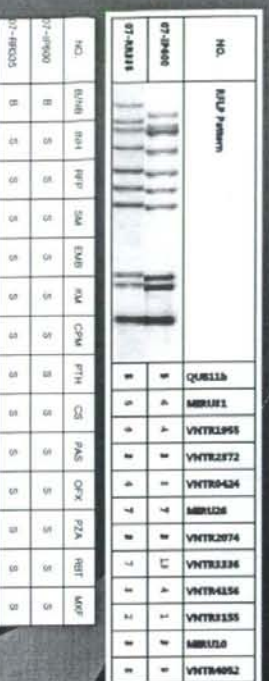


Comparison of cluster groups analyzed in each genotyping method(1)

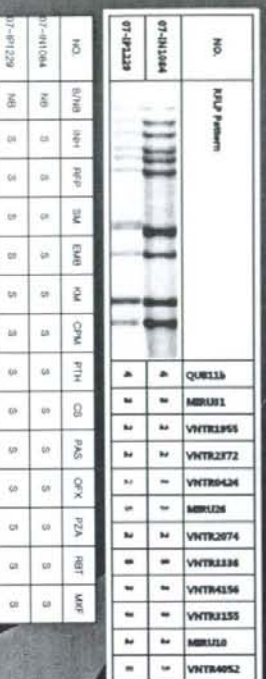


* K: Kanamycin resistance gene in MT
 R1-R11: cluster groups in RFLP method when position base pair setting is 5%
 R12-K: cluster groups in RFLP method when position base pair setting is 1%
 V1-V4: cluster groups in VNTR typing

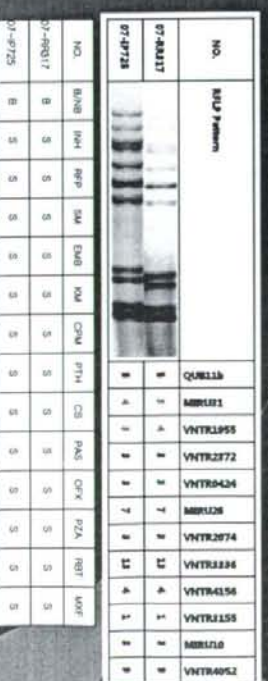
Estimation of cluster R4 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR



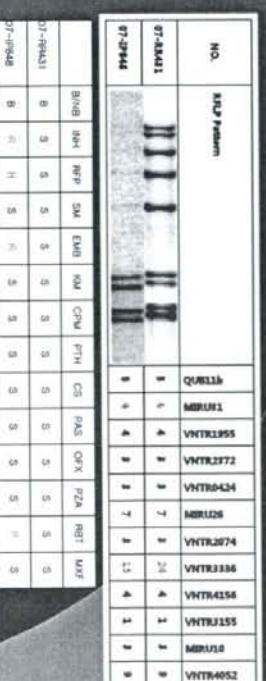
Estimation of cluster R5 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR



Estimation of cluster R2 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR



Estimation of cluster R3 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR



Summary(1)

To determine the presence of either Beijing or non-Beijing strains for the 28 strains, we applied the PCR method.

20 strains(71.4%) are belonged to the Beijing evolutionary lineage, 7 strains(25.0%) are belonged to the non-Beijing evolutionary lineage, and 1 strain(3.6%) isn't observed any PCR amplification.

We need more analyses to define more effective combination of VNTR loci between Beijing and non-Beijing strains.

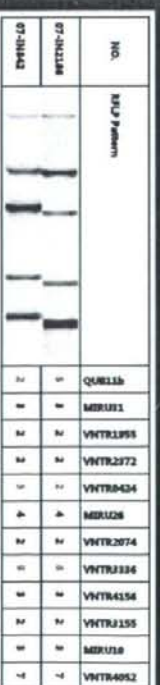
Summary(2)

RFLP typing differentiated 11 genotypes when position tolerance setting is 5% in analysis software and 15 genotypes when position tolerance setting is 1%. So the former HGDI is 0.913 and the latter is 0.937.

VNTR typing differentiated 22 genotypes among the 28 isolates. So HGDI is 0.976.

So the discriminatory power of VNTR using JATA 12-locus is higher than RFLP.

Estimation of cluster R10 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR



NO.	IS6110	REP	SM	EMB	RM	CPM	PTH	CS	PAN	CPA	PZA	ROT	MOR	AMN	GAT
07-042186	NG	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-042187	NG	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-042188	NG	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Estimation of cluster R11 in IS6110RFLP using 12-locus(JATA) VNTR



NO.	IS6110	REP	SM	EMB	RM	CPM	PTH	CS	PAN	CPA	PZA	ROT	MOR	AMN	GAT
07-042187	NG	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
07-042189	NG	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
07-042190	NG	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Thank you~~~!!

Summary(3)

Especially, the strains containing low IS6110 copy number(1 and 5) are certainly divided into each different genotype.

Therefore 12-locus JATA VNTR is more effective genotyping method for these TB strains.

The *h* value presented discriminatory power of each VNTR locus is the most high in VNTR3336 and the most low in MIRU10.

Summary(4)

Only 3 out of 7 strains belonged to cluster R2(K strain) revealed identical VNTR profiles.

So VNTR typing could compensate IS6110RFLP typing to clarify K strain.

However we found one strain which showed identical VNTR profile with K strain but different IS6110 profile.

So we need more data to set up precise classification.

Use of mycobacterial interspersed repetitive unit variable-number tandem repeat(MIRU-VNTR) genotyping to analyze the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis*

National Tuberculosis Reference Laboratory

China CDC

Objective

TB is a heavy burden for most of country in Asia. A technique for strain typing of *M. tuberculosis* based on MIRU-VNTR has been introduced. A number of studies have proven that MIRU-VNTR typing is a reliable and reproducible genotyping method, this PCR-based method can be performed easily, and this typing method also has a high discriminatory power for *M. tuberculosis* strains.

Objective

To provide some data to make comparison with other countries.

To evaluate the usefulness of MIRU-VNTR typing in China.

Materials and Methods

1. Clinical isolates and DNA samples

M. tuberculosis clinical isolates were selected from different provinces of China. (different regions)

M. tuberculosis DNAs were obtained by resuspending mycobacterial colonies into 100–200ul 10mM Tris-HCl/1mM EDTA (pH 7.0) followed by incubation at 95 °C for 30 min. After centrifugation of the suspension, the supernatant containing the DNA was harvested and stored at -20 °C until further use.

M. tuberculosis H37Rv were used as controls.

Materials and Methods

MIRU-VNTR PCR

PCR primers flanking each polymorphic MIRU-VNTR locus and conversion table were sent by molecular epidemiology division, mycobacterium reference center, Tokyo, Japan.

Each MIRU-VNTR locus was individually amplified in a 20ul reaction volume in a 96-well PCR plate.

Materials and Methods

The reaction mixture contained:

- 0.2u M concentration of each primer,
- 0.2 mM concentration (each) of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP,
- 2.0 mM MgCl₂,
- 1 × Q solution,
- 1 × PCR buffer,
- 1 U of HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany),
- and 2ul of DNA.



Materials and Methods

Thermocycling parameters:

- 95°C 15 min,
- then 30 cycles of 94°C 30sec, 63°C 30sec, 72°C 2min.
- 72°C 7min
- 4°C ∞



Materials and Methods

MIRU-VNTR analysis:

The PCR fragments were separated on 2% agarose gel. The sizes of the amplicons were estimated by comparison with 50- and 100-bp marker. The numbers of MIRUs per locus were calculated with Bio-Rad software on the basis of convention table. The MIRU-VNTR allelic diversity (h) at each of the 15 loci was calculated by the equation:

$$h = 1 - \sum X_i^2 / n(n-1)$$

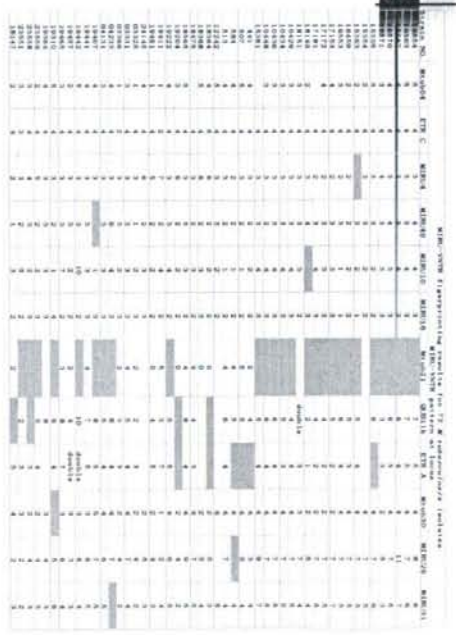
where x_i is the frequency of the i th allele at the locus and n is the number of isolates.



Results



Results



Results

No.	locus	Alias	<i>h</i>	No.	locus	Alias	<i>h</i>
1	0424	Mtub04	0.777	9	2165	ETR A	0.719
2	0577	ETR C	0.155	10	2401	Mtub 30	0.595
3	0580	MIRU4	0.613	11	2996	MIRU26	0.766
4	0802	MIRU40	0.657	12	3192	MIRU31	0.786
5	0960	MIRU10	0.743	13	3690	Mtub 39	0.502
6	1644	MIRU16	0.692	14	4052	QUB26	0.739
7	1955	Mtub 21	0.752	15	4156	QUB4156	0.583
8	2163b	QUB 11b	0.819				

THANKS

Strategy

- Test and optimize the 19 VNTR loci using ABI 3100 Genetic Analyzer.
 - ↳ H37Rv
 - 4 Japanese strains
 - KIH5015CS, KIH5054SH, KIH2037KS, KIH6045NT
- Using optimized loci to test the clinical strains from three provinces in China
- Determine the discriminatory power of different loci



- H37Rv as the standard to evaluate the ABI genetic analyzer.

Evaluation of 19 VNTR Loci in Differentiate *M. tuberculosis* Strains in China

Xia Li

Fudan University

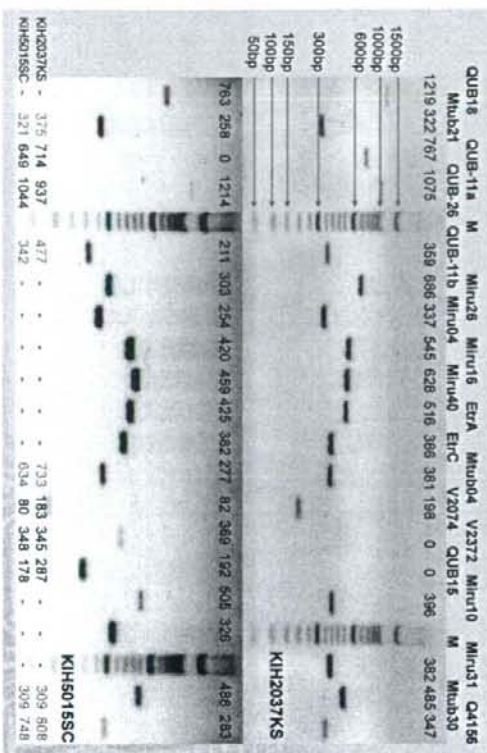
Our Task

MIRU04	MIRU40	ETR A	QUB 11b
MIRU10	Mtub04 (VNTR0424)	ETR C	QUB 15
MIRU16	Mtub21 (VNTR1955)	VNTR2074	QUB 26
MIRU26	Mtub30 (VNTR2401)	VNTR2372	QUB 4156 (VNTR4156)
MIRU31	Mtub39 (VNTR3690)	VNTR3336	

Compare with Japanese Strains

VNTR loci	KIH2037KS			KIH5015SC		
	Expected	Analyzer	Agarose gel	Expected	Analyzer	Agarose gel
QUB-18	-	992.2	10.4	1319.0	11.3	-
Mirb21	3	300.2	3.7	322.0	4.0	3
QUB-11a	8	709.1	8.0	797.0	8.8	8
QUB-26	7	878.2	6.7	1076.0	8.6	8
QUB-11b	4	239.5	3.9	359.0	4.2	2
Mirub3	8	633.2	8.1	686.0	9.2	1
Miruf	2	312.2	2.6	337.0	2.9	1
MirU16	3	497.0	2.7	545.0	3.6	1
MirU40	3	497.9	2.6	628.0	6.1	2
etrA	4	430.0	3.3	518.0	4.6	3
etrC	4	381.8	3.1	396.0	3.7	4
MirU04	4	340.4	4.0	381.0	4.8	4
VNTR2074	3	182.8	2.4	198.0	2.6	1
VNTR2372	3	-	-	-	-	3
QUB-15	4	415.0	6.0	-	-	2
MirU10	3	361.2	2.6	396.0	3.3	5
MirU31	5	347.7	4.4	382.0	5.1	4
Mirub30	4	468.4	3.7	485.0	4.0	4
QUB-156	5	316.3	4.4	347.0	4.9	4

Electrophoresis of Japanese Strains



Expected and Observed Results in H37Rv

VNTR loci	Amplicons in H37Rv	Results
MIRU 04	353	341 -12
MIRU 10	378	364 -14
MIRU 16	471	459 -12
MIRU26	387	390 3
MIRU31	264	257 -7
MIRU 40	408	398 -10
ETR A	420	419 -1
ETR C	382	361 -21
Mirub04	269	244 -15
Mirub21	206	200 -6
Mirub30	363	358 -5
Mirub39	388	489 101
VNTR 2074	249	238 -11
VNTR 2372	298	273 -25
VNTR 3356	407	-
QUB-11b	412	409 -3
QUB-26	708	684 -24
QUB 15	297	283 -14
QUB-156	224	215 -9

Optimized 19 loci VNTR

MIRU04	MIRU40	ETR A	QUB 11b
MIRU10	Mirub04 (VNTR0424)	ETR C	QUB 15
MIRU16	Mirub21 (VNTR1955)	VNTR2074	QUB 26
MIRU26	Mirub30 (VNTR2401)	VNTR2372	QUB 4156 (VNTR4156)
MIRU31	Mirub39 (VNTR3690)	VNTR3336	

VNTR3820	QUB-11b	QUB-18	QUB-11a	MIRU26	QUB-26	Mirub21
----------	---------	--------	---------	--------	--------	---------

19 VNTR loci

Strain	Qub-26	Qub-11b	Mir26	Muc21	Qub-18	Qub-11a	Mir210	ETRA	Muc24	VNTR2372
D3647	3	4	5	3	6	5	2	3	2	2
CS1	4	6	7	8	6	8	3	4	4	2
H903	4	5	7	4	11	8	3	4	4	2
CS3	5	6	7	5	8	8	1	4	4	2
CS9	5	6	8	5	11	8	3	4	4	2
Strain	Mir20	Q4196	Muc30	Mir24	Mir21	Qub15	VNTR2074	Mir26	ETRC	
D3647	2	3	2	3	3	4	2	3	3	
CS1	2	3	4	3	4	3	2	3	3	
H903	3	4	4	3	4	4	2	3	3	
CS3	2	3	4	3	4	3	2	3	3	
CS9	3	4	4	3	4	3	2	3	3	

$HCI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$
 Hunter P. R. and M. A. Gaston, J Clin Microbiol, 1998

The Stability of the Analyzer

- We tested the 19 loci in H37Rv for five times and read the VNTR repeat number.

VNTR	QUB-11b	QUB-18	QUB-11a	MIR226	QUB-26	Muc21
Expected	5	5	2	3	5	2
4.8	5.2	2.1	2.8	5	1.9	
4.9	5.3	2	3.1	5.1	2.1	
Electro- phoresis	4.7	5	1.9	2.6	4.8	2
5.9	5.3	2.1	2.9	5.1	2	
5.1	5.4	2.4	3	5.1	2	
Genetic analyzer	4.8	5	2	2.8	4.8	1.9
4.8	4.8	5	2	2.8	4.8	1.9
4.8	4.8	5	2	2.8	4.8	1.9
4.8	4.8	5	2	2.8	4.8	1.9

45 VNTR loci in Chongming

- Chongming Island is the third largest island which has a population of 635,000 people, mostly farmers and some migrants.
- 2003-2005, 224 clinical isolates were available
- 45 VNTR loci were used to test 189 of the total 224 isolates
- Two optimized sets of loci, VNTR-7 and VNTR-16, were the most parsimonious and discriminatory sets of loci.



Zhang L, et al. (2008). FEMS Microbiol Lett 282: 22-31

Strains selected

