

锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗类风湿关节炎患者前后的肠道菌群变化

陈昌明,黄钊炜,曾 苹,姚血明,刘 灿,王 莹,马武开

摘要 **目的** 探讨锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液(^{99Tc}-MDP)治疗类风湿关节炎(RA)患者前后的肠道菌群变化。**方法** 采集RA患者在应用^{99Tc}-MDP治疗前和治疗后的新鲜粪便样本各32例,提取粪便基因组DNA,利用Illumina Miseq测序平台对样本16S rRNA V3-V4区域进行测序,对测序结果进行生物信息学分析。**结果** Alpha多样性分析中,两组样本间Chao、observed species、Shannon及Simpson指数差异无统计学意义,但治疗后组均大于治疗前组。肠道菌群组成及结构差异分析显示门水平上两组所含优势菌群的相对丰度差异无统计学意义,而软壁菌门(*Tenericutes*)的相对丰度在经治疗后降低($P < 0.05$)。属水平上,治疗后组的瘤胃菌属、丁酸菌、克里斯滕森菌属_R-7_group、霍尔德曼氏菌属等菌属的相对丰度减少($P < 0.05$),而巴氏杆菌属、毛状厌氧杆菌属及口腔杆菌属的相对丰度增加($P < 0.05$)。**结论** RA患者经^{99Tc}-MDP治疗前后的肠道菌群出现一定差异,且多样性有一定程度升高。

关键词 类风湿关节炎;肠道菌群;锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液;16S rRNA

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0310-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.028

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)发病机制复杂,包括遗传因素、环境因素及免疫功能紊乱等,其中肠道菌群失调作为重要的环境因素在RA的发病及病情进展中发挥重要作用^[1-2]。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)、来氟米特(leflunomide, LEF)、硫酸羟氯喹(hydroxychloroquine sulfate, HCQ)等传统抗风湿药物连用是目前临床规范化治疗RA的主要方案。锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射

液已用于RA的临床治疗,且疗效较好,克服了传统抗风湿药起效慢,不良反应率高的缺点^[3]。现有研究^[4]认为肠道菌群与传统抗风湿药物及宿主之间存在相互影响作用,而暂无研究锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液对RA患者肠道菌群的影响。因此,该研究主要检测锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗RA前后患者肠道菌群的丰度、物种组成及多样性,探讨肠道菌群与宿主的相互影响,为阐述RA患者肠道菌群的特征及提高RA患者的临床治疗有效性和安全性提供参考。

1 材料与方法

1.1 纳入与排除标准 纳入标准:①临床诊断符合2010年ACR/EULAR的RA分类标准^[5],RA患者病情评价(DAS28评分) > 3.2 分;②应用锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液(成都云克药业有限责任公司,A:200527,B:2005309)进行治疗,无用药禁忌;③年龄在75岁以下,行动不受限者。排除标准:①有胃肠炎、消化道溃疡、胃肿瘤等严重胃肠道病史;②2个月内服用过抗生素、DMARDs、糖皮质激素等药物;③2周内服用中草药制剂、微生物制剂、酸奶等;④近期存在不洁饮食或酗酒等特殊饮食习惯;⑤合并有高血压、糖尿病、高脂血症等严重心血管系统疾病或代谢性疾病;⑥合并有系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、多发性硬化症等其他自身免疫性疾病;⑦妊娠、哺乳期妇女或精神疾病患者;⑧擅自停药或失访者。

1.2 病例资料 按照纳入排除标准筛选2019年9-11月贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科收治的明确诊断为RA的患者32例,并且使用锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液联合MTX(15 mg/周)进行治疗,患者疼痛及活动明显时,短期应用美洛昔康(7.5 mg/天)。就诊基本信息见表1。本研究方案经医院医学伦理委员会批准,患者知情同意并签署知情同意书。

1.3 样品采集 对于符合纳入标准的RA患者,根据患者应用锝^[99Tc]亚甲基二膦酸盐注射液分为治

2021-12-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81760907);贵州省科技计划项目(编号:黔科合支撑[2020]4Y155号、黔科合平台人才[2016]5650、黔科合平台人才[2020]2202号)

作者单位:贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科,贵阳 550001

作者简介:陈昌明,女,讲师;

马武开,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:walker55@163.com

表1 患者就诊基本信息

患者基本情况	治疗前组 (n=32)	治疗后组 (n=32)	P 值
年龄(岁)	59.19 ± 10.29	-	-
性别(男/女)	7/25	-	-
BMI (kg/m ²)	22.41 ± 3.90	-	-
ESR (mm/h)	65 (21~136)	44 (8~88)	0.010 5
CRP (mg/L)	12.82 (7.50~22.80)	5.21 (1.20~12.6)	<0.000 1
RF (IU/ml)	107.75 (21.80~227.20)	72.78 (8.30~182.30)	0.015 9
抗-CCP	269.18 (58.45~500)	-	-
PLT (×10 ⁹ /L)	262.59 ± 92.45	235.75 ± 85.48	0.239 7
DAS28-ESR (分)	5.35 ± 0.96	4.48 ± 1.15	0.001 8
TEN-28 (个)	10 (8~16)	8 (2~16)	0.000 2
SW-28 (个)	4 (2~9)	2 (0~7)	0.000 2
平均病程(月)	102.09 ± 53.64	-	-

BMI: 体质指数; ESR: 红细胞沉降率; CRP: C-反应蛋白; RF: 类风湿因子; 抗-CCP: 抗环瓜氨酸抗体; PLT: 血小板; DAS28-ESR: 28个关节的疾病活动度评分; TEN-28: 28个压痛关节数; SW-28: 28个肿胀关节数

疗前组(A组)及治疗后组(B组)。收集患者入院第一天粪便样本,即A组样本。待给予[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗1个疗程(10d)后,收集患者粪便样本,即B组样本。

1.4 基因组DNA的提取及上机测序 分别用采集匀挑取收集好的粪便样本中间部分置于无菌管中并置于冰上待用,每个样本称取0.2g分装于2ml无菌EP管中,剩余样本存于-80℃冰箱。采用粪便基因组DNA提取试剂盒(北京TIANGEN公司,DP328)提取粪便基因组DNA并利用琼脂糖电泳检测基因组DNA的纯度。Nanodrop定量后取适量检测合格的肠道菌群DNA样本于离心管中,用无菌水稀释至1ng/ml用作模板,使用Takara Ex TAq(日本Takara公司)高保真酶和细菌16S rRNA高变区V3-V4引物(338F: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3', 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')进行PCR扩增。PCR产物使用电泳检测,检测后使用磁珠纯化,纯化后作为二轮PCR模板,并进行二轮PCR扩增,并再次使用电泳检测,检测后使用磁珠纯化。随后进行文库制备、文库质检及Qubit定量,利用Illumina HiSeq 2500高通量测序平台对检测合格的文库样本进行16S rRNA测序分析。

1.5 生物信息学分析

1.5.1 数据处理统计 使用Trimmomatic (version 0.35)、Flash (version 1.2.11)、split_libraries (version 1.8.0)及UCHIME (version 2.4.2)软件对测序生成的raw data进行低质量部分剪切、拼接、过滤,得到有效数据(clean data)。

1.5.2 OTU分类 利用Vsearch (version 2.4.2)

软件以有效数据97%的相似度进行基于序列间相似度的分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类,选取丰度最高的序列作为该OUT的代表序列。采用RDP classifier Naive Bayesian分类算法对代表序列与数据库进行比对注释,得到OTU的注释信息。

1.5.3 Alpha多样性分析 Alpha多样性(简称α多样性)指某个群落内部或环境内部物种的多样性,重点关注群落内的物种多样性及均匀度,通过单样本的多样性分析来反映样本内微生物群落的丰富度和多样性,物种丰富度和多样性主要通过α多样性指数(Simpson, Chao1, Shannon, Observed species)来表示。本研究利用α多样性指数计算统计法对A、B两组数据进行α多样性分析,通过计算指数,采用Wilcoxon rank sum test进行α多样性指数差异分析。

1.5.4 Beta多样性分析 Beta多样性(简称β多样性)指不同环境条件下群落之间物种组成的相似性及差异性。本研究利用R软件对Weighted的UniFra距离矩阵分别进行非度量多维尺度分析(nonmetric multidimensional scaling, NMDS),并用二维排列图显示群落样本的结构分布。

1.5.5 群落结构分布 对A、B两组数据在门、纲、目、科、属、种各个不同的分类层级,进行相对丰度的注释以及汇总,并进行barplot统计并绘制Circos样本与物种关系图。

1.6 统计学处理 两组之间比较如果符合正态分布且方差齐,采用配对样本的t检验或独立样本t检验,不符合正态分布采用Wilcoxon rank sum检验或Mann-Whitney U检验, P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 测序结果 本次测序共64个样本,质控之后的干净标签数据量分布在48 152~51 989之间, clean tags经过去除嵌合体得到有效标签 valid tags(即最终用于分析的数据)数据量分布在29 578~49 022之间,各样本OTU个数分布在331~1 680之间。

2.2 α多样性分析 利用α多样性指数Observed species绘制稀释曲线:观察到的物种数目随着测序数量的增加而上升,当随机抽取序列条数到6 000至8 000条时,观察到的物种数目逐渐趋向于平缓(图1A),提示已有数据量合理,可以反映样本中的

物种多样性;利用 Shannon 多样性指数构建的稀释曲线:当每个样本中随机抽取序列条数到 1 000 左右时,曲线则趋向于平坦(图 1B),说明测序数据量足够,能够反应样本中大多数微生物的多样性信息。

另外,相较于 RA 患者治疗前,RA 患者经得[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗后反应物种丰富度指数的 Chao1 及 Observed species 指数有上升趋势,但差异无统计学意义,提示 RA 患者经得[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗后肠道菌群丰富度及多样性有一定程度的上升(表 2)。

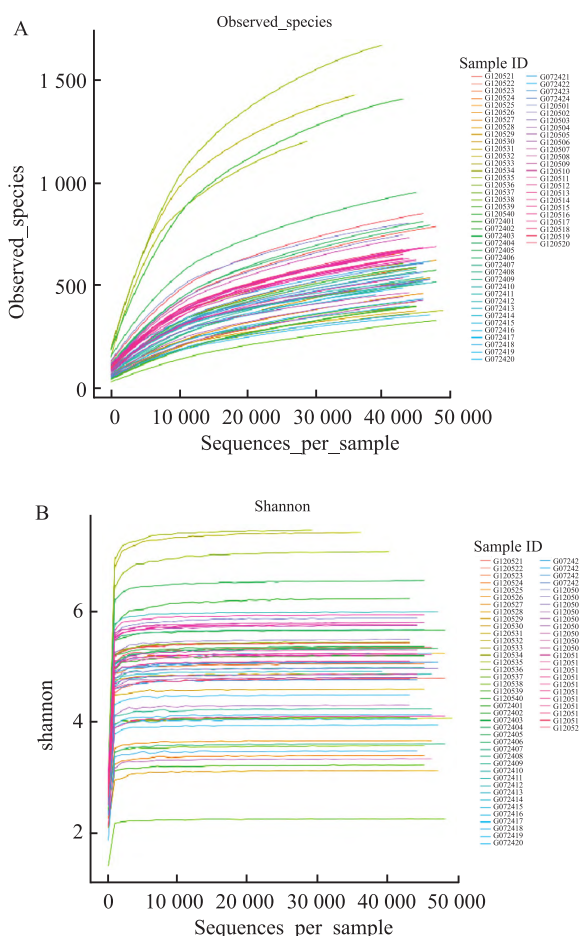


图 1 Observed species 指数 (A)、Shannon 指数 (B) 的稀释曲线图

表 2 治疗前组与治疗组 α 多样性指数数据

多样性指数类型	治疗前 (n = 32)	治疗后 (n = 32)	P 值
Chao1	1 222.065 4	1 434.916 1	>0.05
Observed_species	922.401 2	1 069.021 4	>0.05
Shannon	6.773 1	6.773 9	>0.05
simpson	0.971 8	0.972 1	>0.05

2.3 β 多样性分析 通过 Weighted UniFrac NMDS 分析显示,在两组之间有一定的重叠,但能形成较能

区分的两组整体肠道群落结构,并且 Stress = 0.092 < 0.2,故此分析较为可靠(图 2)。

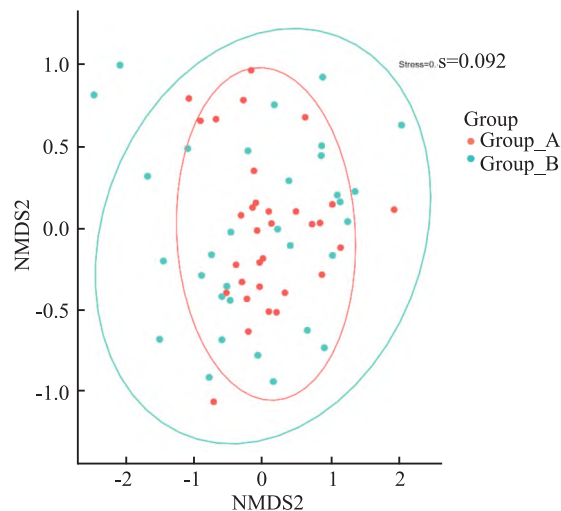


图 2 NMDS 分析图

2.4 RA 治疗前后肠道菌群差异分析 根据物种注释结果,选取每个样品在门、纲、目、科、属以及种水平上最大丰度排名前 15 的 OUT,生成相对丰度柱形累加图。从门的水平上看,两组样本中检测到的拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)及梭杆菌门(*Fusobacteria*)为优势菌群,占细菌总数 99% 以上(图 3A)。用 Metastats 统计学算法对序列量差异进行比较检验得到 B 组所占比例靠前的菌群相对丰度无差异($P > 0.05$),软壁菌门(*Tenericutes*)丰度降低($P < 0.05$)(图 3B)。

进一步在属水平上对 RA 治疗前后肠道菌群进行比较分析,与 RA 治疗前相比,RA 经得[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗后肠道菌群的相对丰度发生一定变化(图 4A),其中瘤胃菌属_UCG-004 (*Ruminococcaceae_UCG-004*)、瘤胃菌属_UCG-013 (*Ruminococcaceae_UCG-013*)、瘤胃菌属_UBA1819、丁酸菌(*Butyricoccus*)、稀少菌群克里斯滕森菌属_R-7_group (*Christensenellaceae_R-7_group*)、霍尔德曼氏菌属(*Holdemania*)、厌氧弧菌属(*Anaerovibrio*)、戈登氏杆菌属(*Gordonibacter*)、毛绒厌氧杆菌属(*Lachnoanaerobaculum*)及 *Cellulosimicrobium* 菌属的相对丰度减少($P < 0.05$),而巴氏杆菌属(*Pasteurella*)、毛绒厌氧杆菌属(*Lachnoanaerobaculum*)及口腔杆菌属(*Stomatobaculum*)的相对丰度增加($P < 0.05$)(图 4B)。

本研究对应用锝[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗 RA 患者前后的新鲜粪便样本进行 16S rRNA 分析。结果表明在应用锝[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液治疗后,RA 患者的肠道菌群多样性有一定程度的升高,说明 RA 患者的肠道菌群在经治疗后得到了一定的恢复。利用 Metastats 分析得出治疗后的软壁菌门、瘤胃菌属_UCG-004、瘤胃菌属_UCG-013、瘤胃菌属_UBA1819、稀少菌群丁酸菌、克里斯滕森菌属_R-7_group、霍尔曼氏菌属、厌氧弧菌属、戈登氏杆菌属、毛绒厌氧杆菌属及 *Cellulosimicrobium* 菌属的相对丰度降低;而相对丰度增加的菌属有巴氏杆菌属、毛绒厌氧杆菌属及口腔杆菌属。

软壁菌门又称柔壁菌门,菌体无细胞壁,只有一种称为单位膜的原生质膜包围在菌体四周,目前暂无报道 RA 与软壁菌门丰度的改变有关。Di Paola et al^[15] 在比较青少年特发性关节炎(JIAc)患者与健康人群肠道菌群结构时发现,JIA 患者粪便中瘤胃菌科丰度增加。而瘤胃菌属会在反应性关节炎、强直性脊柱炎、腺瘤、直肠癌、炎症性肠病等状态下大量扩增,本研究显示治疗后组的瘤胃菌属的相对丰度下降,说明锝[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液能够抑制瘤胃菌属,对人体来说是有益的,值得进一步探讨。

由于该研究的样本量相对较少以及存在一定的地域差异及个体差异,并且患者粪便中的菌群也不能完全反映人体肠道中的固有定植菌群,所以本研究有一定的局限性。进一步研究锝[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液对患者肠道菌群的影响需要扩大样本,并建立动物模型验证实验结果,并对药物影响的差异细菌进行深入探讨。

参考文献

- [1] Maeda Y, Takeda K. Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(12):1-6.
- [2] 柳晓,徐涛. SIRT1 与类风湿关节炎的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(9):1496-500.
- [3] 严瑾,荣晓凤. 云克联合甲氨蝶呤、来氟米特治疗类风湿关

- 节炎远期疗效观察[J]. *中国药房*, 2012, 23(16):1485-7.
- [4] Sayers E, MacGregor A, Carding S R. Drug-microbiota interactions and treatment response: Relevance to rheumatoid arthritis[J]. *AIMS Microbiol*, 2018, 4(4):642-54.
- [5] Aletaha D, Neogi T, Silman A J, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: An American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(9):2569-81.
- [6] Reinoso Webb C, Koboziev I, Furr K L, et al. Protective and pro-inflammatory roles of intestinal bacteria[J]. *Pathophysiology*, 2016, 23(2):67-80.
- [7] Donaldson G P, Lee S M, Mazmanian S K. Gut biogeography of the bacterial microbiota[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(1):20-32.
- [8] Teng F, Klinger C N, Felix K M, et al. Gut microbiota drive autoimmune arthritis by promoting differentiation and migration of peyer's patch T follicular helper cells[J]. *Immunity*, 2016, 44(4):875-88.
- [9] Gomez A, Luckey D, Yeoman C J, et al. Loss of sex and age driven differences in the gut microbiome characterize arthritis-susceptible 0401 mice but not arthritis-resistant 0402 mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e36095.
- [10] Rastawicki W, Jagielski M, Gierczyński R, et al. Role of *Salmonella* and *Yersinia* in the pathogenesis of spondyloarthropathies and rheumatoid arthritis. II. Antibodies to *Salmonella* and *Yersinia* in sera and synovial fluids[J]. *Med Dosw Mikrobiol*, 2005, 57(2):143-51.
- [11] Scher J U, Sczesnak A, Longman R S, et al. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis[J]. *Elife*, 2013, 2:e01202.
- [12] 田珈瑜,荣晓凤. 锝[⁹⁹Tc]亚甲基二膦酸盐注射液联合 DMAIDs 治疗晚期类风湿关节炎的临床观察[J]. *中国药房*, 2017, 28(2):240-2.
- [13] Zhang X, Zhang D, Jia H, et al. The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment[J]. *Nat Med*, 2015, 21(8):895-905.
- [14] 刘雪梅. DMARDs 治疗类风湿关节炎前后肠道菌群的变化[D]. 遵义:遵义医科大学,2019.
- [15] Di Paola M, Cavalieri D, Albanese D, et al. Alteration of fecal microbiota profiles in juvenile idiopathic arthritis. Associations with HLA-B27 allele and disease status[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7:1703.

Changes of gut microbiota before and after treatment of technetium [⁹⁹Tc] methylenediphosphonate injection in rheumatoid arthritis

Chen Changming, Huang Zhaowei, Zeng Ping, Yao Xueming, Liu Can, Wang Ying, Ma Wukai
(Dept of Rheumatology and Immunology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University
of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001)

Abstract Objective To investigate the changes of intestinal flora in patients with rheumatoid arthritis (RA)

网络出版时间:2022-1-20 14:33 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220119.1137.027.html

滑膜肉瘤中 P300 与 EMT 相关蛋白的表达及临床意义

陈浩^{1,2}, 张贞^{3*}, 王宁^{1,2}, 董双双^{1,2}, 连小娟⁴, 梁伟华^{1,2}, 蒋金芳^{1,2}, 庞丽娟^{1,2}, 齐妍^{1,2,5}

摘要 目的 通过检测滑膜肉瘤(SS)组织中组蛋白乙酰转移酶 P300 及上皮间叶转化(EMT)相关分子的表达,探讨 P300 在 SS 双相分化及 EMT 中的作用及临床意义。**方法** 收集 40 例 SS 石蜡包埋组织样本,运用 RT-PCR 方法检测 SS 的 SYT-SSX 融合基因亚型;免疫组化检测 P300 及 EMT 相关分子的表达。**结果** ① 40 例 SS 中[双相型滑膜肉瘤(BSS) 30 例,单相型滑膜肉瘤(MFSS) 10 例], 37 例存在 SYT-SSX 融合基因(包括 SYT-SSX1、SYT-SSX2),其中 BSS 为 90% (27/30) (SYT-SSX1 66.7%, SYT-SSX2 33.3%); MFSS 为 100% (10/10) (SYT-SSX1 80%, SYT-SSX2 20%), SS 组织学

类型与融合基因类型的差异无统计学意义。② 95% (38/40) 的 SS 病例表达 P300, 包括 93.3% (28/30) 的 BSS 以及 100% (10/10) 的 MFSS, P300 的表达与 SS 组织学类型的差异无统计学意义。③ P300 与 SS 患者临床病理参数间的差异无统计学意义;但 COX 回归分析显示肿瘤转移 ($P = 0.019$) 和 TNM 分期(III ~ IV) ($P = 0.003$) 是患者总体生存时间的独立危险因素。④ BSS 中 P300 阳性的病例与 EMT 相关蛋白 β -catenin 的表达差异有统计学意义 ($P = 0.027$); MFSS 中 P300 阳性的病例与 EMT 相关蛋白 Slug 的表达差异有统计学意义 ($P = 0.048$), 提示 P300 与 EMT 密切相关。**结论** P300 可能参与 SS 的双相分化。P300 可能参与 SS 的 EMT 过程,提示 P300 在 SS 的侵袭迁移中发挥了一定作用。**关键词** 滑膜肉瘤; P300; SYT-SSX; 上皮间叶转化; 免疫组织化学

2021-12-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860471);石河子大学国际科技合作推进计划(编号:GJHZ201710);中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2020-PT330-003)

作者单位:¹ 石河子大学医学院病理系/第一附属医院病理科,石河子 832000

² 国家卫健委中亚高发病防治重点实验室,石河子 832000

³ 郑州市第三人民医院病理科,郑州 450000

⁴ 重庆市江津区中心医院肿瘤科,重庆 402260

⁵ 湛江中心人民医院病理科,湛江 524000

作者简介:陈浩,男,硕士研究生;

齐妍,女,教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: qiyanyan-2004@126.com

* 对本文具有同等贡献

中图分类号 R 738.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)02-0315-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.029

滑膜肉瘤(synovial sarcoma, SS)是一种较少见的具有双相分化、高侵袭性的软组织肿瘤,约占软组织肉瘤的 10%;特征是存在特异性 t(X;18)(p11;q11)易位产生 SYT(18q11.2)-SSX(Xp11.2)融合基因,是 SS 主要致瘤因素且在临床病理诊断中发挥重要作用。SS 的组织形态学主要有 BSS 和 MFSS 两种类型,前者在梭形细胞背景下表现为腺体或巢团

before and after treatment with technetium [⁹⁹Tc] methylenediphosphonate injection (⁹⁹Tc-MDP). **Methods** Thirty-two patients with RA were collected the fresh fecal specimens before and after they treated with ⁹⁹Tc-MDP. The genome DNA of fecal specimens was extracted and the V3-V4 regions of 16S rRNA were sequenced by Illumina Miseq platform. The sequencing results were analyzed by bioinformatics methodology. **Results** The Chao, observed species, Shannon and Simpson index between the two groups in Alpha diversity analysis had no statistical difference ($P > 0.05$), but the value in post-treatment group were increased compared with the pre-treatment group. Compared with the pre-treatment of RA, there was no statistical difference in the higher proportion relative abundance on Phylum level of the intestinal microbes of RA patients, and the relative abundance of *Tenericutes* decreased ($P < 0.05$). At the genus level, the relative abundance of *Ruminococcaceae*, *Butyricoccus*, *Christensenellaceae_R-7_group*, *Holdemania* decreased after treatment ($P < 0.05$). And the relative abundances of *Pasteurella*, *Lachnoanaerobaculum* and *Stomatobaculum* increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The abundance and species of gut microbiota in RA patients have some changes after treatment with ⁹⁹Tc-MDP, and the diversity increases after treatment.

Key words rheumatoid arthritis; gut microbiota; ⁹⁹Tc-MDP; 16S rRNA