

· 实验研究 ·

上海市 2000 - 2002 年 91 株结核分枝杆菌分子流行病学分析

梅建 沈鑫 查佳 孙斌 沈梅 沈国妙 高谦

【摘要】 目的 探讨上海地区结核病分子流行病学特点。方法 对从上海市疾病预防控制中心菌株库中随机抽取的 2000 - 2002 年各 50 株耐药和敏感菌株进行间隔区寡核苷酸分型 (Spoligotyping) 和分枝杆菌散在分布重复单位 (MIRU) 基因型分型, 并结合流行病学资料进行分析。结果 抽样菌株中, 具有特异 Spoligotyping 指纹图谱的北京基因型菌株在上海地区分布达 89% (81/91)。未接种过卡介苗 (BCG) 的患者中北京基因型菌株占 88.5% (54/61), 接种过 BCG 的患者中北京基因型菌株占 90% (27/30), 差异无统计学意义。北京基因型菌株耐药率为 45.7% (37/81), 低于非北京基因型菌株的耐药率 60.0% (6/10), 差异无统计学意义。MIRU 成簇菌株占所有菌株的 62.6% (57/91)。结论 北京基因型菌株在上海地区有广泛分布, 北京基因型菌株与 BCG 接种和耐药无关, 结核病患者中有部分是由于近期传播而引起的。

【关键词】 结核分枝杆菌; 流行病学, 分子; 基因分型

Study on the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai MEI Jian*, SHEN Xin, ZHA Jia, SUN Bin, SHEN Mei, SHEN Guo-miao, GAO Qian. *Department of Tuberculosis Control, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China
Corresponding Author: Mei Jian, Email: jiehe@scdc.sh.cn

【Abstract】 Objective To explore the molecular-epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Shanghai. Methods Drug-resistant and drug-susceptible strains of *M. tuberculosis* were randomly selected from the bank of *M. tuberculosis* of Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention and were genotyped by mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) and Spoligotyping methods. The genotyping results were analyzed and combined with epidemiological data. Results The Spoligotyping results demonstrated that 89% (81/91) of the strains belonged to the Beijing genotype. Of the patients who had received BCG-vaccination, 88.5% (54/61) infected with strains of Beijing genotype and 90.0% (27/30) of the patients were not BCG-vaccinated. However, the difference was not statistically significant. Drug-resistant rate from those strains of Beijing genotype was 45.7% (37/81), lower than that of non-Beijing genotype (60.0%, 6/10). Again, the difference was not statistically significant. The MIRU results showed that 62.6% (57/91) were strains of clusters. Conclusion The Beijing genotype of *M. tuberculosis* were found to be the dominant strains in Shanghai. The associations between Beijing genotype strains and BCG vaccination or drug-resistant were not found. Results from cluster analysis suggested that some cases might belong to the newly developed cases.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Epidemiology, molecular; Genotype

上海市近年来结核病疫情有所上升, 尤其是外来流动人口报告肺结核病例数年递增率达到 10% 左右^[1]; 因此阐明上海市结核病流行特点和传播规律对于采取有效的防治措施具有重要意义。北京基

因型菌株是一类具有特异间隔区寡核苷酸 (Spoligotyping) 指纹图谱的菌株^[2]; 在世界上许多地区引起多次爆发, 而且引起爆发的菌株均为耐药菌株^[3]; 我国南北方以及香港地区分布广泛^[4-7]。本研究运用 Spoligotyping 和分枝杆菌散在分布重复单位 (MIRU) 分型方法对上海地区的临床菌株进行了基因型分型, 以初步了解北京基因型菌株在上海地区的分布及其流行病学特点。

基金项目: 上海市卫生局资助项目 (034027)

作者单位: 200336 上海市疾病预防控制中心结核病预防科 (梅建、沈鑫、孙斌、沈梅); 复旦大学医学院教育部分子病毒重点实验室 (查佳、沈国妙、高谦)

通讯作者: 梅建, Email: jiehe@scdc.sh.cn

材料与方 法

1. 菌株来源与选择: 实验菌株来源于上海市疾病预防控制中心菌株库中所保存的 2000-2002 年全市各区(县)结核病定点医院所收集的菌株。根据药敏试验结果, 我们将 2676 株临床菌株分为敏感菌株组(2375 株)和耐药菌株组(301 株), 然后按照简单随机抽样的方法分别从两组中选择 50 株菌株。由于某些抽样菌株不能复苏, 最后对 91 株菌株进行了 Spoligotyping 和 MIRU 基因型分型, 其中耐药 48 株, 敏感 43 株。

2. 流行病学调查: 对每株菌, 上海市疾病预防控制中心结核病病例登记管理数据库中保存有该患者的资料, 包括: 性别、年龄、居住地、发病及治疗情况、痰涂片、细菌培养、药敏试验、菌型鉴定等结果。

3. 主要仪器及试剂: 基因扩增仪为美国 Applied Biosystems 公司产品; $2 \times$ Taq PCR MasterMix 和 50 bp DNA Ladder 为北京天为时代公司产品; Spoligotyping kit 以及 Miniblotter MN45 为瑞典 Isogen Bioscience 公司产品。

4. 药敏试验: 参照《结核病诊断细菌学检验规程》中绝对浓度法进行^[8]。

5. 结核分枝杆菌 DNA 提取和定量: 结核分枝杆菌基因组 DNA 的提取参考 Hermans 等^[9]的方法略加改进。固体培养基上生长的结核分枝杆菌重悬于 400 μ l 的 TE 中, 80 $^{\circ}$ C 灭活 30 min, 振荡分散后用 20 μ l 的 50 mg/ml 溶菌酶在 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h。然后加 70 μ l 10% SDS 和 10 μ l 20 mg/ml 蛋白酶 K, 振荡混匀后, 68 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。加 100 μ l 5 mol/L NaCl 和 100 μ l 10% CTAB 后振荡混匀, 在 68 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。然后用酚: 氯仿(1:1)抽提 DNA 2 次, 用 0.6 体积的异丙醇沉淀 DNA。DNA 溶解在 100 μ l TE 中, 加入 10 μ l 10 mg/ml 的 RNase, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 酚: 氯仿抽提后酒精沉淀。DNA 干燥后溶解于 50 μ l 的 TE 中。在核酸定量仪上测定吸光度 A_{260} 和 A_{280} 的值, 以确定 DNA 的含量和纯度。

6. Spoligotyping 基因型分型: 分型使用 Isogen Bioscience 公司 Spoligotyping 试剂盒, 按照说明书操作。以 10 ng 左右的 DNA 作为模板, PCR 法扩增间隔序列。PCR 产物与固定在膜上的短核苷酸序列杂交, 用 ECL 系统检测杂交信号。

7. MIRU 基因型分型: 参照文献[10]的方法以及网站 <http://www.ibl.fr/mirus.mirus.html>。合成

12 对用于扩增 MIRU 位点的引物, 在 20 μ l PCR 反应体系中含有引物 0.4 μ mol/L, $2 \times$ Taq PCR MasterMix 10 μ l, 10 ng DNA 模板。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

8. 统计学分析: 采用 Stata 7.0 软件进行数据处理与分析, 对北京基因型菌株与卡介苗(BCG)接种、耐药之间的关系按照 Fisher's 确切概率法计算 P 值。

结 果

1. 患者基本情况: 91 例患者中年龄最大 83 岁, 最小 13 岁, 平均 51 岁; 男性 66 例(72.5%), 女性 25 例(27.5%); 初治患者 75 例(82.4%), 复治患者 16 例(17.6%); 市区患者 39 例(42.9%), 郊区患者 52 例(57.1%)。48 例耐药患者中, 单耐利福平 4 例(8.3%), 单耐异烟肼 8 例(16.6%), 单耐链霉素 28 例(58.3%), 耐利福平 + 异烟肼 3 例(6.3%), 耐利福平 + 链霉素 2 例(4.2%), 耐利福平 + 异烟肼 + 链霉素 1 例(2.1%), 耐利福平 + 异烟肼 + 链霉素 + 乙胺丁醇 2 例(4.2%)。

2. Spoligotyping 分型结果及北京基因型菌株在上海地区的分布: 91 株菌株共分为 20 种 Spoligotyping 基因型, 89% (81/91) 菌株的 Spoligotyping 指纹图谱与“北京基因型”菌株的特征指纹图谱一致。该结果说明北京基因型菌株是上海地区主要流行菌株。

3. 北京基因型菌株与 BCG 接种及耐药的关系: 由于上海市是从 20 世纪 50 年代后期开始 BCG 接种的, 1960 年前出生的人群中 BCG 接种者较少。为分析方便, 所以我们以 1960 年为界, 1960 年前出生的患者都计入未接种过 BCG, 而 1960 年及以后出生的患者都计入接种过 BCG, 以此来分析北京基因型菌株是否与 BCG 接种有关。结果显示, 未接种和接种过 BCG 的患者中北京基因型菌株分别占 88.5% (54/61) 和 90.0% (27/30), 但差异无统计学意义 ($P = 1.000$); 未接种和接种 BCG 的患者中非北京基因型菌株分别为 11.5% (7/61) 和 10.0% (3/30)。为了解北京基因型菌株是否与耐药有关, 我们对北京和非北京基因型菌株的耐药情况进行了分析。本次抽样菌株中, 北京基因型菌株耐药率为 45.7% (37/81), 低于非北京基因型菌株的耐药率 60.0% (6/10), 但差异无统计学意义(表 1)。

4. MIRU 分型及成簇情况分析: MIRU 是一种

新的简单快速、具有高分辨率的结核分枝杆菌分型方法^[11],我们用该方法对抽样菌株进行了分析。分型结果显示,91株菌株共得到46种MIRU基因型,在81株北京基因型菌株中,共有39种不同的MIRU基因型。我们将具有完全相同MIRU基因型的菌株定义为“簇”菌株。91株菌株中,共有57个菌株为簇菌株,成簇菌株占有所有菌株的62.6%;这些簇菌株可分为12个簇,其中最大的1簇含有18个菌株,另外有1簇含9个菌株、各有2簇分别含3个和6个菌株、有6簇含2个菌株,其余34种基因型均只含有1个菌株。

表1 北京基因型菌株与耐药的关系

药敏结果	北京基因型(%)	非北京基因型(%)	P值
耐药	37(45.7)	6(60.0)	0.508
敏感	44(54.3)	4(40.0)	
合计	81(100.0)	10(100.0)	

注:括号外数据为例数,括号内数据为百分比

讨 论

根据不同国家结核病分子流行病学研究显示,北京基因型菌株在全球范围内都有广泛分布^[3]。本次抽样调查显示,北京基因型菌株在上海地区的分布达89%。北京基因型菌株在全球范围内广泛分布的原因尚不得而知。van Soolingen等^[6]曾推测北京基因型菌株是由于BCG广泛接种而导致的选择性优势的结果。但是在越南及印度尼西亚进行的研究结果显示^[12,13],北京基因型菌株与BCG接种没有联系。从本研究结果来看,接种过BCG与未接种过BCG患者中北京基因型与非北京基因型菌株的分布无显著差异,因此不支持这种假设,与张立兴等^[5]的结果一致。

由于耐药北京基因型菌株多次引起爆发性流行,使得北京基因型菌株与耐药之间的关系成为了研究的热点,但是研究结果大不相同。有些文献报道,北京基因型菌株耐药率高于非北京基因型菌株,如越南胡志明市、爱沙尼亚、纽约等地区^[12,14];也有文献报道,北京基因型菌株与非北京基因型菌株的耐药率无显著差异,如印度尼西亚、阿塞拜疆、哥伦比亚等地区^[13,15];而香港地区北京基因型菌株的耐药率甚至低于非北京基因型菌株^[7]。本研究结果显示,北京基因型菌株的耐药率(45.7%)低于非北京基因型菌株(60.0%),但差异无统计学意义,不支持北京基因型菌株更易产生耐药的推断。

在结核病分子流行病学中通常将具有相同

IS6110-RFLP基因型的菌株称为“簇”菌株。若从不同患者分离的菌株属于同簇菌株,同时流行病学调查结果也表明患者之间有接触史,那么说明不同患者之间有近期感染。目前也有研究者根据MIRU基因型的成簇结果来研究结核病的近期感染^[16]。本次MIRU分型结果,共得到12个簇。我们追踪簇菌株的人群资料,发现其中3簇菌株所对应的部分患者居住在同一辖区。最大一簇18个菌株所对应的患者中,有3例患者在同一辖区内居住,另外有三个辖区内各有2例患者居住。由于本课题未对同簇菌株患者进行深入的流行病学调查,尚无足够的证据可以显示具有同簇菌株的患者间有过接触史,因此不能认为具有同簇菌株的患者之间都是由近期传播引起的。尽管我们还不能回答在上海地区结核病的近期传播究竟占多大比例,但我们的结果提示结核病患者中有部分是由于近期传播而引起的。

参 考 文 献

- 1 梅建,沈梅,夏珍,等.上海市肺结核疫情控制主要影响因素分析.上海医学,2002,9:546-549.
- 2 Kremer K, Glynn JR, Lillebaek T, et al. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. J Clin Microbiol, 2004, 42: 4040-4049.
- 3 Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, et al. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. Emerg Infect Dis, 2002, 8: 843-849.
- 4 李卫民,王苏民,裴秀英,等.北京、广东、宁夏三地结核分枝杆菌DNA指纹的应用研究.中华流行病学杂志,2003,24:381-384.
- 5 张立兴,丁北川,屠德华,等.北京结核菌株分子流行病学的研究.中国防痨杂志,2001,23:141-147.
- 6 van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. J Clin Microbiol, 1995, 33: 3234-3238.
- 7 Chan MY, Borgdorff M, Yip CW, et al. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. Epidemiol Infect, 2001, 127: 169-171.
- 8 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程.中国防痨杂志,1996,18:28-31.
- 9 Hermans PW, van Soolingen D, van Embden JD. *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. J Bacteriol, 1992, 174: 4157-4165.
- 10 Kwara A, Schiro R, Cowan LS, et al. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol, 2003, 41: 2683-2685.
- 11 Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, et al. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 1901-1906.
- 12 Anh DD, Borgdorff M, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. Emerg Infect Dis, 2000, 6: 302-305.
- 13 van Crevel R, Nelwan RHH, de Lenne W, et al. *Mycobacterium*

tuberculosis Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. Emerg Infect Dis, 2001, 7: 1-4.

14 Kruuner A, Hoffner SE, Sillastu H, et al. Spread of drug-resistant pulmonary tuberculosis in Estonia. J Clin Microbiol, 2001, 39: 3339-3345.

15 Laserson KF, Osorio L, Sheppard JD, et al. Clinical and programmatic mismanagement rather than community outbreak as the cause of chronic, drug-resistant tuberculosis in Buenaventura,

Colombia, 1998. Int J Tuberc Lung Dis, 2000, 4: 673-683.

16 Blackwood KS, Wolfe JN, Kabani AM. Application of mycobacterial interspersed repetitive unit typing to Manitoba tuberculosis cases: can restriction fragment length polymorphism be forgotten? J Clin Microbiol, 2004, 42: 5001-5006.

(收稿日期: 2004-09-09)

(本文编辑: 尹廉)

· 网络信息 ·

流行病学案例教学的网络资源简介

王劲松

“案例教学法”是对某一特定情景的客观书面描述或介绍,其目的在于为学生提供模拟的实践情景,使他们从中获得锻炼,提高独立的工作能力。实施案例教学法就必须有足够的高质量案例可供使用;而互联网为我们提供了极佳的平台。在网络上有许许多多的流行病学网站以及相关资料,利用它们可以很好地完成这一任务。

本科层次的流行病学教学内容主要为疾病的分布、描述性研究、分析性研究和实验性研究以及其他领域的介绍。案例性质可分为现场流行病学案例、临床流行病学案例等,从研究方法可分为观察性研究案例、实验性研究案例、理论流行病学研究案例等。与之相应的网络资源类型有:流行病学教学软件、流行病学软件、流行病学电子期刊、新闻组、讨论组、政府机构和国际组织报告、流行病学数据库等。一般通过搜索引擎选用合适的关键词都能找到中意的案例素材,当然大部分素材还需要经过教师的加工才能真正适用。

美国疾病预防控制中心(CDC)和 WHO 在促进流行病学教育方面奉献了大量优秀作品。他们不仅提供相关数据库及应用软件,还有培训用的教学案例直接供大家使用。WHO 的“The world health report”(http://www.who.int/whr/en/)提供了从 1995 年至今各年度的研究报告,其中既有报告文件也有相关数据文件可供选用,其内容覆盖了流行病学的大部分领域。用于案例教学可使学生在学习的同时了解世界的疾病负担和控制状况,有利于培养宏观意识。更为方便的是 WHO 的“World Health Organization Library Database”(WHOLIS, http://dosei.who.int/uhtbin/webcat)可以检索 1948 年至今 WHO 的各种文件并获得 1986 年以来的技术文档和杂志内容。其媒体中心(http://www.who.int/mediacentre/multimedia/topics/en/)有图片、声音、视频等多媒体资料,它们是对各种健康事件的描述和对健康政策的阐述。CDC Wonder(www.wonder.cdc.gov)是 CDC 建立的数据检索系统,该系统覆盖了 CDC 网站数据与统计信息服务的全部内容。通过该系统,用户可检索死亡率周报(MMWR)及包括科研数据、调查监督数据、卫生统计数据 and

实验室信息等各类公共卫生数据。CDC 慢性病预防与健康促进网页(http://www.cdc.gov/nccdphp)提供了慢性病调查与监测项目的大量资料,它们包括了最短也达到 15 年的六大监测系统的体系、调查表、结果报告、疾病发展趋势和现状分析、危险行为及特殊人群统计学分析资料。

而 CDC-EIS(epidemic intelligence service, http://www.cdc.gov/eis/casestudies/casestudyex.htm)是结合抗击流行病实际设计的一组流行病学培训项目;它是从 1951 年发展起来的案例教学的典范,很多 EIS 毕业生成为各国的卫生事业领导者。所提供的每个案例附带两个文件,分别是教师和学生手册。在网页上,每个案例标明了学习的目标,使用者可以根据需要自行选择下载。在手册中,一般案例均分为四个部分:首先描述案例的发生情况以及背景资料,然后介绍调查和临床工作,利用其数据资料计算相应研究或评价指标,最后再作出结论。在这个过程中会有相应的问题,教师手册中附有答案。由于它是专门为教学设计的,因此完全可直接使用,更可作为双语教学的材料。而且它结合当前流行病学实际工作,内容会随培训课程而更新,同样的案例也会不断修订,这些都成为用于案例教学的绝佳素材。

此外,匹兹堡大学的超级课堂(http://www.pitt.edu/~super1/index.htm)提供了许多国家的众多专业人员完成的流行病学讲座,它按领域、作者、设计方法、资料来源等进行分类,使用者可以很方便地查询到所需材料。UCLA 提供了部分流行病学课程的 PPT 和 PDF 文件(http://www.ph.ucla.edu/epi/courses.html),其中也有一些案例可供使用。解说者网站(http://www.exponent.com/practices/index.html)是专业分析既往案例的缺陷和原因从而达到预防目的的网站,其中包括众多范围广泛的案例,可以大大拓展教学内容,增加课堂的趣味性。商业网站也开展这方面工作,公众健康基金会(public health foundation, http://bookstore.phf.org/prod121.htm)提供教材的购买服务,在其网站对教材的介绍中可以发现引用了许多案例,他还有各种流行病学案例的书籍出售。

(收稿日期: 2004-12-16)

(本文编辑: 尹廉)