

# 聚合酶链反应扩增指纹多态性快速分型技术在部队结核病分子流行病学研究中的应用

曾年华 王志斌 唐博恒 肖红 王珊珊 李兴国 黄佳亮 姜普林 吴春刚

**【摘要】** 目的 探讨南方部队结核病的分子流行病学规律。方法 设计一对特异性 IS6110 外向性引物,应用聚合酶链反应(PCR)建立检测结核分支杆菌 DNA 指纹多态性的方法,分析结核分支杆菌 DNA 多态性与流行病学的关系。结果 共检测分析了 154 株结核分支杆菌 DNA 的指纹多态性。根据这些菌株的指纹多态性特征共分为 8 个类型,以 I 型(36.4%)、II 型(31.8%)和 III 型(21.4%)为主,其余各型均少于 4%。以 20~29 岁和 30~39 岁组在这三型中所占比例最大,分别为 31.8%和 27.9%。驻城镇部队与驻乡村部队以及结核病患者有无卡介苗接种史,在这三型的分布差异无显著统计学意义( $P > 0.05$ )。但初治与复治患者分离菌株的 PCR 扩增指纹类型的分布差异有显著统计学意义( $P < 0.05$ )。所检测菌株是否具有耐药性,在这三型中的分布差异也有显著统计学意义( $P < 0.05$ )。菌株耐药主要为单耐异烟肼和利福平,耐药菌株在 I、II、III 型中所占比例分别是 44.4%、29.6%和 14.8%。结论 PCR 扩增指纹多态性分型技术是一种简便、快速、敏感、特异和重复性好的分型方法,可用于结核病的分子流行病学研究。南方部队结核分支杆菌的传播以 I、II、III 型为主,应加强此三型菌株流行的监控。

**【关键词】** 结核杆菌; DNA 指纹法; 流行病学, 分子

**Study on molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Chinese army with PCR amplified fingerprinting methods** ZENG Nian-hua, WANG Zhi-bin, TANG Bo-heng, XIAO Hong, WANG Shan-shan, LI Xing-guo, HUANG Jia-liang, JIANG Pu-lin, WU Chun-gang. The Medical Institute of Military in Guangzhou Command, Guangzhou 510507, China

**【Abstract】** **Objective** Typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and epidemiological studies in the army of southern China to provide scientific basis for prevention of pulmonary tuberculosis. **Methods** A rapid fingerprinting of *M. tuberculosis* strains method by polymerase chain reaction (PCR) with outward-directed primers that designed to the ends of the insertion sequence IS6110 was developed, and to analyze the relationship between the polymorphism of DNA fingerprinting and epidemiology of *M. tuberculosis*. **Results** One hundred and fifty-four *M. tuberculosis* detected were classified into eight types according to their characters of PCR amplified fingerprints. The main types were type I (36.4%), type II (31.8%), and type III (21.4%), while other types were less than 4 percentage. In those main type groups, patients aged 20 to 29 and 30 to 39 took up 31.8% and 27.9% respectively. For those main types, the distribution of those types in the first treated patients showed significant difference compared with that in the retreated patients, and the rate of drug-resistance was also statistically different. However, the distribution was not statistically significant to history of BCG vaccination and patients living in urban or rural area. The main drug-resistant strains were only Isoniazid-resistant or Rifampin-resistant strains, while the drug-resistant strains were 44.4%, 29.6% and 14.8% respectively in type I, type II and type III. **Conclusion** PCR fingerprinting was a rapid, precise, sensitive, specific method to type *M. tuberculosis*, and could be used to study the epidemiology of tuberculosis. The prevalence of tuberculosis was primarily due to the transmission of type I, type II and type III in the army being studied from Southern China, to suggest that surveillance needs to be strengthened.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; DNA fingerprints; Epidemiology, molecular

我国是结核病高发国家,结核病的防治研究是

目前我国疾病控制的重要课题。通过对结核分支杆菌进行分子流行病学研究,可为制订结核病防治对策提供可靠的科学依据。结核病的分子流行病学研

基金项目:全军青年基金资助项目(98Q020)

作者单位:510507 广州军区联勤部军事医学研究所流行病学研究室

究主要是应用分子生物学技术,对结核分支杆菌的 DNA 多态性进行分析。结核分支杆菌具有重复 DNA 片段多态性特征。这种特征主要体现在其特异性插入序列 IS6110 在细菌中存在的数量和位置的差异<sup>[1]</sup>。利用结核分支杆菌的多态性特征,可研究结核病爆发性流行,传染源的追踪寻找,鉴别内源性复发和外源性再感染,以及耐药菌株的传播和实验室交叉污染等问题<sup>[2,3]</sup>。目前,国内外实验室常用的限制性片段长度多态性(RFLP)分析法,是一种较经典的方法<sup>[4]</sup>。但该方法需经过培养获取较多的细菌后才能提取出分析所需的 DNA,并经过限制性内切酶消化,免疫转印,探针杂交等过程来检测,虽然这样能获得理想的多态性分析结果,但由于步骤多、时间长、技术条件复杂,使实际应用受到限制。有必要探索简便、快速和可靠的新方法用于结核分支杆菌的多态性分析。为此,我们参照国外文献<sup>[5,6]</sup>,以结核分支杆菌插入序列 IS6110 为基础,设计一对外向性引物,通过聚合酶链反应(PCR)扩增产生不同分子量大小的扩增片段,获得了良好的多态性分析结果。应用该方法,我们对近 4 年来从南方部队结核病患者中分离出的结核分支杆菌进行了分型,并结合患者的流行病学资料进行了分析,以此探索南方部队结核病的分子流行病学规律。

### 材料与方 法

1. 结核分支杆菌标准菌株及 Marker: 结核分支杆菌标准菌株 H<sub>37</sub>Rv(93009),购自中国药品生物制品检定所。100 bp DNA Marker,购自威佳生物工程公司。

2. 临床标本的来源及患者相关资料: 检测标本来自南方部队指定收治结核病的几家中心医院和总医院。收集时间为 1997 年 1 月至 2002 年 1 月。均为肺结核患者,共 154 例。其中男性 150 例(97.4%),女性 4 例(2.6%);干部 68 例(44.2%),战士 86 例(55.8%);入伍时间 < 6 个月者 18 例;部队驻地在城镇 72 例,驻地在乡村 82 例;年龄 < 20 岁 23 例,20~29 岁 56 例,30~39 岁 47 例,≥40 岁 28 例;初治 118 例,复治 36 例;接种过卡介苗者(有卡痕)102 例,未接种者(无卡痕)52 例。

3. 结核分支杆菌 DNA 的制备: 检测标本常规处理后,接种于 7H12B 液体培养基(购自美国 Becton Dickinson 公司),37℃ 孵箱培养,以 Bactec 460-TB 自动检测仪(购自美国 Becton Dickinson 公

司)观察细菌生长情况,至有菌生长,抗酸染色鉴定,并进行耐药性检测。取相应液体培养基,80℃ 1 h 灭活,10 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 TE 裂解缓冲液稀释,沸水煮 15 min,10 000 r/min 离心 5 min,上清液用于 DNA 多态性检测。

4. PCR 引物的设计: 以参考文献[5,6]为基础,并加以改进。在结核分支杆菌 DNA 插入序列 IS6110 的序列中,选择靠近 IS6110 序列末端的碱基作为外向性引物,使得每个引物的延伸,产生插入序列末端的拷贝,并与染色体 DNA 相连接。其中正向引物 TB1 在 IS6110 的第 1 292~1 309 碱基对位置,序列为 5'-CGC CAG AGA CCA GCC GCC-3',反向引物 TB2 在 IS6110 的 111~92 碱基对位置,序列为 5'-CCG CAC CGC CCG CTC ACG CA-3'。引物合成委托上海生工生物工程公司(上海生工)进行。

5. PCR 的扩增条件: 扩增反应在 50 μl 反应体积中进行。反应体系中含引物 TB1 和 TB2 各 25 pmol/L,0.2 mmol/L dNTP(上海生工产品),10×Taq 酶 buffer 5 μl,Taq 酶 2.5 U(上海博彩产品),被检 DNA 模板 5 μl,双蒸水补充至反应体积,30 μl 无菌石蜡油封顶。置 PCR 扩增仪(PE,美国产品),按下列参数扩增: 首先 94℃ 预热 3 min,然后 94℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 5 min,30 个循环后,72℃ 延伸 7 min。电泳观察结果。

6. 琼脂糖凝胶电泳: 取 12 μl 扩增产物,在 1.2% 琼脂糖(Spanish 产品,含 0.5 μg/ml 溴化乙锭)凝胶上电泳。电泳完毕,在紫外成像检测系统(美国 NR 公司产品)下观察结果。并与 DNA Marker 比较扩增带的分子量大小。通过观察到的 DNA 指纹带的数量和位置进行分类比较。

7. 统计学分析: 将检测菌株呈现的 PCR 扩增指纹数据化,输入计算机,然后进行相关因素的归类整理,并进行统计学分析。

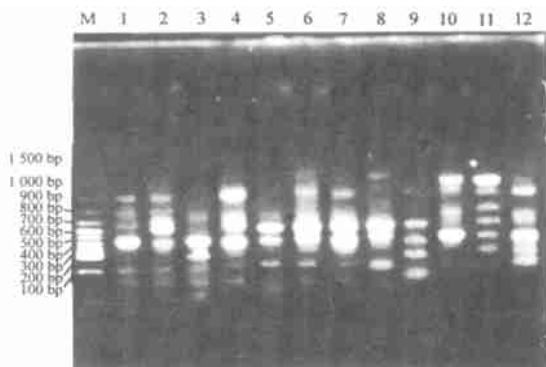
### 结 果

#### 1. 检测标本结果的重复性:

(1) 不同批次的重复性结果: 每次试验设立的阳性对照菌株 DNA 扩增指纹完全相同;所有检测菌株均重复检测 2 次,2 次结果亦完全一致。

(2) 同一批次的重复性结果: 从检测标本中随机抽取 15 株不同 DNA 扩增指纹的菌株,每株重复检测 5 次,每次 DNA 扩增指纹结果也完全相符。

2. 菌株 PCR 扩增指纹分型: 共对 154 株结核分支杆菌 DNA 进行了指纹检测, 根据被检菌株扩增后电泳所呈现的片段数量和分子量大小, 本次所检菌株可分为 8 个 PCR 指纹类型。所有扩增片段其分子量大小均在 1.5 kb 以内。各类型的 DNA 指纹有较多的相似特征。大多数被检菌株具有 6 条位置相近的扩增片段(图 1)。在这 8 个类型指纹中, 以 I、II 和 III 型占检测标本的大多数(89.6%)。其中 I 型占 36.4%(56/154), II 型占 31.8%(49/154), III 型占 21.4%(33/154); 而其余 5 型所占比例均 < 4%, 合计仅占 10.4%(16/154)。



M: 100 bp DNA Marker; 1~12: 检测标本

图1 应用 PCR 扩增指纹分型技术检测部分结核分支杆菌标本的指纹图

3. PCR 扩增指纹特征与结核病患者年龄的关系: 在各年龄组中, I、II 和 III 型在 20~29 岁和 30~39 岁年龄组所占比例最大, 分别是 31.8%(49/154) 和 27.9%(43/154)。如表 1 所示, 不同年龄组菌株 PCR 指纹多态性虽存在差异, 但经统计学检验, I、II 和 III 型在各年龄组间的差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

表1 PCR 扩增指纹在不同年龄组结核病患者中的分布

年龄组 (岁)	I 型菌株数 (%)	II 型菌株数 (%)	III 型菌株数 (%)	其他 5 型菌株数 (%)	合计
< 20	9 (39.1)	6 (26.1)	6 (26.1)	2 (8.7)	23
20~	17 (30.3)	23 (41.1)	9 (16.1)	7 (12.5)	56
30~	19 (40.4)	13 (27.7)	11 (23.4)	4 (8.5)	47
≥ 40	11 (39.3)	7 (25.0)	7 (25.0)	3 (10.7)	28
合计	56 (36.4)	49 (31.8)	33 (21.4)	16 (10.4)	154

注: I、II 和 III 型在各年龄组间的分布, 经统计学卡方检验,  $\chi^2 = 4.50, v = 6, P > 0.05$ ; 括号内数据为构成比

4. 各型菌株 PCR 指纹与结核病患者驻地类型的关系: 表 2 显示, 患者所在部队驻地环境与菌株 PCR 指纹类型的分布, 差异无显著统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表2 各型菌株 PCR 扩增指纹与结核病患者所在部队驻地类型的关系

部队驻地	I 型菌株数 (%)	II 型菌株数 (%)	III 型菌株数 (%)	其他 5 型菌株数 (%)	合计
城镇	29 (36.2)	23 (28.8)	19 (23.7)	9 (11.3)	80
乡村	27 (36.5)	26 (35.1)	14 (18.9)	7 (9.5)	74
合计	56 (36.4)	49 (31.8)	33 (21.4)	16 (10.4)	154

注: 部队驻城镇与驻乡村的患者 I、II 和 III 型指纹的分布差异经卡方检验,  $\chi^2 = 0.90, v = 2, P > 0.05$ ; 括号内数据为构成比

5. 各型菌株 PCR 指纹类型与结核病患者初治和复治的关系: 如表 3 所示, 初治与复治患者被分离出的结核分支杆菌 DNA 指纹类型中, I、II 和 III 型的分布经检验差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 即初治患者的指纹类型分布与复治患者的指纹分布不同。

表3 分离自初治与复治结核病患者菌株 PCR 扩增指纹分布情况

治疗类型	I 型菌株数 (%)	II 型菌株数 (%)	III 型菌株数 (%)	其他 5 型菌株数 (%)	合计
初治	38 (32.2)	39 (33.0)	31 (26.3)	10 (8.5)	118
复治	18 (50.0)	10 (27.8)	2 (5.6)	6 (16.7)	36
合计	56 (36.4)	49 (31.8)	33 (21.4)	16 (10.4)	154

注: 初治与复治患者之间 I、II 和 III 型指纹的分布经统计学卡方检验,  $\chi^2 = 8.38, v = 2, P < 0.05$ ; 括号内数据为构成比

6. 结核病患者卡介苗接种史对菌株 PCR 指纹类型分布的影响: 患者卡介苗接种史以是否留有接种卡痕为判别依据, 有卡痕者判为接种过卡介苗, 无卡痕者判为未接种卡介苗。表 4 所示, 有无卡介苗接种史在菌株 PCR 指纹类型的分布上, 差异无显著统计学意义 ( $P > 0.05$ )。即患者卡介苗接种史对菌株指纹分布无显著性影响。

表4 结核病患者有无卡介苗接种卡痕与其分离菌株 PCR 扩增指纹分布的关系

卡介苗接种状况	I 型菌株数 (%)	II 型菌株数 (%)	III 型菌株数 (%)	其他 5 型菌株数 (%)	合计
有卡痕	35 (34.3)	32 (31.4)	24 (23.5)	11 (10.8)	102
无卡痕	21 (40.0)	17 (32.7)	9 (17.3)	5 (9.6)	52
合计	56 (36.4)	49 (31.8)	33 (21.4)	16 (10.4)	154

注: 患者有无卡介苗接种卡痕在 I、II 和 III 型指纹分布的差异经卡方检验,  $\chi^2 = 0.98, v = 2, P > 0.05$ ; 括号内数据为构成比

7. 各型菌株 PCR 指纹类型与其耐药性的关系: 如表 5 所示, 对抗痨药物的敏感菌株占大多数 (82.5%), 耐药菌株占少数 (17.5%)。耐药菌株中以单耐异烟肼和利福平为主, 分别占 44.4% (12/27) 和 40.7% (11/27)。被检结核分支杆菌敏感株与耐药株的 PCR 指纹特征分布, 经统计学检验差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

表5 结核分支杆菌的耐药状况与各型菌株 PCR 扩增指纹的分布类型

耐药状况	I 型菌株数(%)	II 型菌株数(%)	III 型菌株数(%)	其他 5 型菌株数(%)	合计
敏感株	40(31.5)	45(35.4)	29(22.8)	13(10.2)	127
耐药株	16(59.3)	4(14.8)	4(14.8)	3(11.1)	27
单耐 INH 或 RFP 或 SM	10(58.8)	3(17.7)	3(17.7)	1(5.9)	
同时耐 2 种	5(62.5)	1(12.5)	1(12.5)	1(12.5)	
耐多药	1(50.0)	0	0	1(50.0)	
合计	56(36.4)	49(31.8)	33(21.4)	16(10.4)	154

注: INH: 异烟肼, REP: 利福平, SM: 链霉素 耐多药: 耐 INH+RFP+SM; 敏感菌株与耐药菌株 I、II 和 III 型 PCR 扩增指纹分布经统计学卡方检验, 两者差异有显著统计学意义( $\chi^2=8.42, v=2, P<0.05$ ); 括号内数据为构成比

### 讨 论

应用分子生物学方法, 对结核分支杆菌进行 DNA 指纹研究, 对结核病的防治具有十分重要的流行病学意义。PCR 扩增直接分型法, 是一种新的简便快速的基因分型技术。该方法的关键是在引物的设计上, 它不同于一般 PCR 检测结核分支杆菌只需获得一条特异扩增带而设计的引物。用于分型 PCR 的引物, 也是以插入序列 IS6110 为基础, 在其两端附近合成直接外向的引物, 使得在 PCR 扩增时产生不同分子量的 DNA 片段。这些不同分子量的 DNA 片段, 主要是基于引物位点或位于两个 IS6110 拷贝之间, 或一个位点在 IS6110 上, 另一个在细菌染色体 DNA 上。尽管可能引物位点不同, 导致不同分子量拷贝的出现, 但不同菌株带型都能准确重复<sup>[5, 6]</sup>。国外学者已证明, 直接 PCR 扩增指纹类型类似于应用 RFLP 分析产生的指纹类型<sup>[7]</sup>。本研究通过改进 PCR 扩增条件, 增大凝胶浓度和样本量, 对 154 例标本进行了重复检测, 结果检测前后带型完全一致。说明本文建立的该方法可有效地对结核分支杆菌进行基因分型。该方法既可作为常规的实验室分析手段, 又可方便地用于大样本研究。对掌握某一地区结核分支杆菌的传播动态, 监测耐药菌株的发展, 具有十分重要的流行病学意义。

本研究采用 PCR 扩增直接指纹分型法, 分析了近 4 年来从南方部队 154 例肺结核病患者分离出的 154 株结核分支杆菌 DNA 指纹。结果显示, 所检菌株根据指纹图谱, 能被分成 8 个类型的指纹。大部分菌株集中在 I、II 和 III 三个类型中, 分别占

36.4%、31.8%和21.4%。这三个类型的指纹间有较多相似之处, 即大部分菌株多态性程度不高, 表明南方部队结核分支杆菌流行菌株有较大的相似性, 从而也说明结核病在南方部队的发生为某些特征菌株的流行, 对制订防治对策有重要的参考意义。

应用 PCR 直接指纹分型法, 通过对南方部队结核菌株的耐药性进行比较。发现检测标本中的耐药菌株在复治病例中所占比例明显高于初治病例。复治病例基因类型的分布与初治病例的基因类型分布, 差异有显著统计学意义( $P<0.05$ )。并且耐药菌株与敏感菌株的基因类型分布差异也有显著统计学意义。这种差异可能由于耐药菌株的基因变异引起<sup>[8]</sup>, 从而也说明这种指纹分型法对耐药菌株的监测也是十分有用的。本文检测的耐药菌株以单耐异烟肼所占比例最多(44.4%), 单耐利福平占其次(40.7%)。这些单耐药菌株基因类型分布也以 I、II 和 III 三个基因类型为主。提示, 南方部队耐药菌株的监测应重点注意单耐异烟肼和利福平菌株的流行趋势。

### 参 考 文 献

- 1 张立兴, 丁北川, 屠德华, 等. 北京结核菌株分子流行病学研究. 中国防痨杂志, 2001, 23:141-147.
- 2 Van Soolingen D. Utility of molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir J, 1998, 11:795-797.
- 3 Hermans PWM, Messadi F, Guebregabher H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and the Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. J Infect Dis, 1995, 171:1504-1513.
- 4 Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardised methodology. J Clin Microbiol, 1993, 31:406-409.
- 5 Neimark H, Baig MA, Carleton S. Direct identification and typing of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR. J Clin Microbiol, 1996, 34:2454-2457.
- 6 Patel S, Wall S, Saunders NA. Heminested inverse PCR for IS6110 fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains. Clin Microbiol, 1996, 34:1686-1690.
- 7 Ross BC, Dwyer B. Rapid, simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the polymerase chain reaction. Clin Microbiol, 1993, 31:329-334.
- 8 钟敏, 温博海, 陈炜, 等. 结核分支杆菌随机扩增多态性 DNA 指纹分型技术及应用研究. 中华检验医学杂志, 2002, 25:91-93.

(收稿日期: 2002-09-10)

(本文编辑: 尹廉)