

· 实验室研究 ·

天津地区临床分离结核分枝杆菌分型的初步研究

柴利泉 李卫民 李丽 戴宗甲 白大鹏 张立 邵世峰 吴琦 陆伟 孙照刚 李传友

【摘要】 目的 探讨天津地区结核分枝杆菌临床分离株分子流行病学特征。方法 连续收集天津市海河医院 2005 年 8 月 16 日-11 月 25 日就诊患者痰培养阳性的结核分枝杆菌 100 株,采用间隔区寡核苷酸分型 (spoligotyping) 和多位点可变串联重复序列 (VNTR) 两种方法进行基因分型,并运用软件对二者的结果进行分析。依据北京分化支的定义,运用多重和实时定量 PCR 方法将其区分为 W 菌/典型北京家族菌株和非典型北京菌株, χ^2 检验分析两种亚群与患者年龄和耐药性之间的联系。结果 排除污染菌株,共对 96 株结核分枝杆菌临床分离株进行两种方法的基因分型, spoligotyping 结果 91.7% 为北京基因型 (含 3 株类北京基因型) 结核分枝杆菌 (88/96)。VNTR 分型可将北京基因型分为 60 种基因型。在北京分化支结核分枝杆菌中, W 菌/典型北京家族菌株占 93.2% (82/88)。两种北京分化支亚群与患者年龄及耐药性之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 天津地区结核病患者临床分离的结核分枝杆菌中,北京基因型呈现较为明显的优势。VNTR 的分辨率明显高于 spoligotyping。北京分化支的两种亚群在天津地区临床结核病患者中均有流行,但以 W 菌/典型北京家族菌株为主。

【关键词】 结核分枝杆菌,北京基因型;北京分化支;W 菌/典型北京家族菌株;非典型北京菌株

Study on the genotype of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from hospitals in Tianjin CHAI Li-quan*, LI Wei-min, LI Li, DAI Zong-jia, BAI Da-peng, ZHANG Li, SHAO Shi-feng, WU Qi, LU Wei, SUN Zhao-gang, LI Chuan-you. *Department Tuberculosis, Haihe Hospital, Tianjin 300350, China
Corresponding author: LI Chuan-you. Department Bacteriology and Immunology, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumour Research Institute, Beijing 101149, China Email: lichuanyou6688@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the characteristics on molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from hospitals in Tianjin area. **Methods** One hundred *M. tuberculosis* isolated strains were collected in succession from August 16th-December 25th, 2005 in Tianjin Haihe Hospital and genotyped by spoligotyping and multiple locus variable number-tandem repeat (VNTR). Data was analyzed by cluster software. Based on the concept of Beijing lineage, it was determinate two sub-groups: atypical Beijing strains and W strain/typical family strains by multiplex and real-time PCR. The associations of sub-groups with drug resistance and age were assessed by the χ^2 test. **Results** 96 *M. tuberculosis* strains were genotyped in which 91.7% (88/96) strains belonged to Beijing genotype (including 3 Beijing-like strains) by spoligotyping. VNTR typing could differentiate 60 genotypes among the 88 Beijing genotype strains. 93.2% of the Beijing lineage *M. tuberculosis* strains of this study belonged to W strain/typical Beijing family strains (82/88). No statistically significant differences were observed in the proportions of the two sub-groups in patients of different age, or drug resistance ($P > 0.05$). **Conclusion** The *M. tuberculosis* Beijing genotype strains were dominated on tuberculosis hospital patients of Tianjin area. The discriminatory power of VNTR typing was higher than that of spoligotyping. The two sub-groups of Beijing lineage had been prevalent in Tianjin, however W strain/typical Beijing family strains were of preponderance.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*, Beijing genotype; Beijing lineage; W strain/typical Beijing family strains; Atypical Beijing strains

在我国结核病仍然是一个严重的公共卫生问

题。1995 年 van Soolingen 等^[1]发现与耐多药 W 株同源的北京家族 (现更名为北京基因型) 结核分枝杆菌。国外的研究也提示^[2], 北京基因型结核分枝杆菌在全球广泛流行。Li 等^[3]研究证实, 北京基因型结核分枝杆菌在我国的流行程度为 64.9%, 且与耐药性无明确的联系。北京基因型结核分枝杆菌在上

基金项目:北京市自然科学基金资助项目 (5062016);北京市优秀人才培养专项经费资助项目

作者单位:300350 天津市海河医院结核科 (柴利泉、李丽、白大鹏、张立、邵世峰、吴琦、陆伟);北京市结核病胸部肿瘤研究所 (李卫民、戴宗甲、孙照刚、李传友)

李卫民、柴利泉具有同等贡献

通讯作者:李传友, Email: lichuanyou6688@hotmail.com

海、北京、宁夏和广东等局部地区的流行特征均有报道^[4,5]。但天津地区北京基因型结核分枝杆菌的流行特征未见报道。

尽管间隔区寡核苷酸分型 (spoligotyping) 是定义北京基因型结核分枝杆菌的基本方法,但其分辨率较低。IS6110-RFLP 指纹方法为结核分枝杆菌基因分型的“金标准”,可以对北京基因型结核分枝杆菌进一步分型,但该方法较为繁琐。近来选择多位点可变串联重复序列 (VNTR) 中的一些位点进行组合,以提高对北京基因型结核分枝杆菌的分辨率,从而替代 IS6110-RFLP 指纹方法的工作一直都在进行^[6]。

Kurepina 等^[6]、Kremer 等^[7] 研究提示,采用上述的基因分型方法分析北京基因型结核分枝杆菌,存在很高的相似性特征。Brosch 等^[8]、Hirsh 等^[9] 从结核分枝杆菌全基因组水平研究提示,北京基因型结核分枝杆菌具有单源性 (monophyletic) 的特性。在以上的工作基础上,学者们结合系统发育的理论提出了结核分枝杆菌北京分化支 (*M. tuberculosis* Beijing lineage) 的概念^[2],并认为该分化支至少有 2 个亚群。北京分化支为 ① spoligotyping 缺失 1~34 间隔区,存在 35~43 间隔区中的至少 3 个; ② *dnaA-dnaN* 区插入 IS6110; ③ 与推荐的 19 个北京分化支参比菌株的 IS6110-RFLP 指纹图谱相比,相似性大于 80% 者为北京分化支,75%~80% 之间者需采用上述两种方法补充鉴定。北京分化支的两个亚群为: W 菌 (W strain)/典型北京家族菌株 (typical Beijing family strains) 和非典型北京菌株 (atypical Beijing strains), 且非典型北京菌株较 W 菌/典型北京家族菌株更接近该分化支的祖先。Plikaytis 等^[10] 依据北京分化支的概念,采用多重 PCR 的方法,通过验证 NTF 区域是否存在 IS6110 直接重复区,从而区分 W 菌/典型北京家族菌株和非典型北京菌株。Brosch 等^[8]、Hirsh 等^[9] 采用基因芯片比较北京基因型和标准菌株 H37Rv 时发现,北京基因型结核分枝杆菌存在特征性长基因序列的缺失,即特征性长序列多态性 (large sequence polymorphisms, LSPs)。Tsolaki 等^[11] 根据这些特征性 LSPs 定义并对北京分化支进行了 W 菌/典型北京家族菌株和非典型北京菌株的亚分群。

本研究使用 spoligotyping 和 VNTR 两种基因分型方法对天津市海河医院临床结核病患者分离的结核分枝杆菌进行分析,并在此基础上进行了北京分化支的亚分群,以探讨天津地区临床分离结核分

枝杆菌的分子流行病学特征。

材料与方 法

1. 材料:

(1) 试验菌株和标准菌株: 连续收集 2005 年 8 月 16 日 - 11 月 25 日在天津市唯一的结核病定点医院—海河医院就诊的结核患者的结核分枝杆菌临床分离株 100 株,经抗酸染色、BACTEC-TB960 鉴定和快速培养证实为结核分枝杆菌。其中有 4 株污染,故共对 96 株完成基因分型。H37Rv 标准菌株由国家结核病参比实验室提供。

(2) 主要试剂和仪器: Miniblotter MN45、生物素 C 膜、Primer Dra 和 Drb 均为荷兰 Isogen Life Science 公司产品, 2×Taq PCR Master Mix 为北京天为时代科技有限公司产品,多重 PCR 试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品,5700 定量 PCR 仪为美国 PE 公司产品,SYBR[®] ExScript[™] RT-PCR Kit 为宝生物工程(大连)有限公司产品。

(3) 引物设计: 14 种 VNTR 分型的 PCR 引物分别参考 Kremer 等^[7] 和沈国妙等^[12] 的设计。6 种用于多重 PCR 的引物参考 Plikaytis 等^[10] 的设计 (表 1)。实时定量 PCR 的引物 (RD105 和 RD181) 参考 Tsolaki 等^[11] 的设计。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 作为引物的寡核苷酸序列

| 引物 | 靶标 | 序列 | 位点 |
|-------|--------|------------------------|-----------|
| IS59 | IS6110 | gcgccaggcgcaggctcgatgc | 216~236 |
| IS60 | IS6110 | gatcagcagatcgttgctctgc | 738~718c |
| IS61 | IS6110 | gaccgaggatctctcgagacc | 133~114c |
| IS62 | IS6110 | accagtactcggcgagcgc | 1237~1256 |
| MDR-6 | NTF-1 | ccagatatacgggtgtgtcgac | 473~494 |
| MDR-7 | NTF-1 | cgcgagatctcatcgacaacc | 52~32c |

2. 方法:

(1) 结核分枝杆菌基因分型: spoligotyping 基因分型参照操作说明^[13]。VNTR 基因分型方法参照 Kremer 等^[7] 的文献。14 种位点分别为 MIRU10, MIRU16, MIRU20, MIRU26, MIRU31, MIRU39, MIRU40, ETR-A, ETR-B, ETR-C, ETR-D, ETR-E, QUB11a, QUB11b。

(2) 结核分枝杆菌北京分化支的亚分群: 北京分化支结核分枝杆菌如果在 NTF 区域插入 2 个拷贝的 IS6110 直接重复区,那么 IS6110 之间的区域为 NTF-1 区^[10]。IS62 和 MDR-7 引物扩增从 IS6110 的 3' 端到 NTF-1 的 5' 端的 175 bp 片段,MDR-6 和 IS61

引物扩增从 NTF-1 的 3' 端到 IS6110 的 5' 端的 223 bp 片段, IS59 和 IS60 从 IS6110 内部扩增 523 bp 片段。鉴于 NTF-1 序列特异性存在于结核分枝杆菌北京分化支典型北京家族菌株同源的 W 株中, 故如果同时扩增出 523 bp、175 bp、223 bp 3 个条带者即为 W 菌; 如果在 NTF 区域仅插入一个拷贝的 IS6110 直接重复区, 扩增出 523 bp 及 175 bp 或 223 bp 2 个条带, 该图谱的菌即为典型北京家族菌株; 其余北京分化支结核分枝杆菌为非典型北京菌株。多重 PCR 反应条件为: 反应体系包括: 2 × QIAGEN Multiple PCR Master Mix, 5 × Q-Solution (扩增增强剂), 8 种引物等; 反应条件为 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 90 s, 72℃ 延伸 90 s, 循环 40 次。

根据 Tsolaki 等^[11] 定义, 结核分枝杆菌如果存在 RD105 的缺失则为北京分化支, 北京分化支中如果存在 RD181 的缺失则为 W 菌/典型北京家族菌株, 其余的北京分化支为非典型北京菌株。实时定量 PCR 以 16S rDNA 为内参基因, RD105 和 RD181 为待测基因。反应体系包括: 2 × SYBR Premix Ex Taq、引物等; 反应条件为 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 20 s, 循环 45 次。

3. 统计学分析: 采用 NatureEdge 主程序, X-Cluster 数值分类插件对 spoligotyping 指纹结果和 VNTR 分型的数字化结果进行聚类分析, 相似系数为 Dice 相似系数, 聚类分析方法为非加权算术平均法 (UPGMA)^[13]。

一个结核分枝杆菌分离株对应一例结核病患者。根据患者年龄 (分别为 <25、25~、51~ 和 >75 岁)、药物敏感谱分组。各组中 W 菌/典型和非典型北京家族菌株依据多重 PCR 指纹图谱确定。 χ^2 检验比较不同病例组中 W 菌/典型和非典型北京家族菌株所占的比例 (SPSS for windows 10.0, SPSS Inc Chicago IL, USA), $\alpha < 0.05$ 。

结 果

1. 北京基因型结核分枝杆菌: 利用 spoligotyping 分型方法, 将 96 株结核分枝杆菌临床分离株进行分型鉴定。其中 85 株为北京基因型、3 株为类北京基因型结核分枝杆菌, 共占全部菌株的 91.25% (88/96), 其余均为非北京基因型菌株。

14 个 VNTR 位点对 96 株结核分枝杆菌进行分型, 其中 93 株可以获得 VNTR 分型结果, 其余 3 株多个位点始终不能扩增出明显条带而无法获得完

整结果 (结合其 spoligotyping 结果发现它们均不是北京基因型结核分枝杆菌)。采用 NatureEdge 主程序, X-Cluster 数值分类插件对 spoligotyping 和 VNTR 分型结果进行聚类分析, 结果见图 1。93 株结核分枝杆菌产生 64 种 VNTR 基因型。88 株北京基因型产生 60 种 VNTR 基因型。VNTR 图谱 3327533-42435-86 的为该群菌株的中心菌。95% 相似性, VNTR 分型可将北京基因型分为 9 个群 (至少 3 个菌株为 1 群)。最大的一群包括 16 株北京基因型结核分枝杆菌。

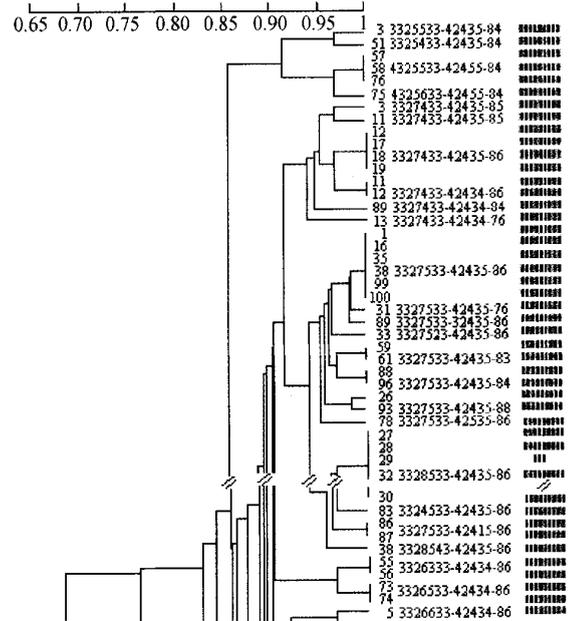
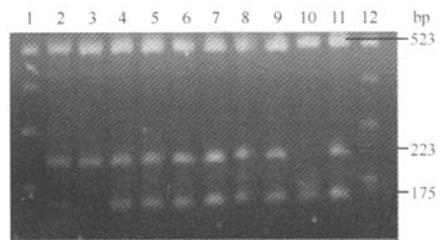


图1 Nature Edge 主程序, X-Cluster 数值分类插件对 93 株结核分枝杆菌的聚类分析结果

2. 北京分化支两种亚群在不同年龄及耐药谱中的分布: 使用多重、实时定量 PCR 方法将 88 株北京分化支进行亚分群 (图 2), 其中 82 株为 W 菌/典型北京家族菌株, 6 株为非典型北京菌株, 且两种方法的亚分群结果完全一致 (结果近期发表)。 χ^2 检验分析两种亚群在各年龄组以及抗结核药物耐药性之间分布的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: 1, 12 为分子量标准; 2, 3, 10 为 W 株; 4~9, 11 为典型北京家族菌株

图2 采用多重 PCR 方法对北京分化支进行亚分型的结果

讨 论

因海河医院为天津市惟一的结核病定点医院,且本研究采用连续不间断方式获取标本,因此样本具有一定的代表性。所获得的结核分枝杆菌两种基因分型结果提示,北京基因型(含类北京基因型)结核分枝杆菌所占比例高达 91.25% (88/96),超过了全国的水平,但与上海地区的水平接近^[3,4]。可见北京基因型结核分枝杆菌在天津地区临床结核病患者中呈较高水平的流行。

本实验采用 Nature Edge 主程序, X-Cluster 数值分类插件对 96 株结核分枝杆菌 spoligotyping 和 VNTR 分型结果进行聚类分析^[14], 结果显示, VNTR 分型方法的分辨率较 spoligotyping 方法高得多。纵然是 95% 的相似性, VNTR 仍可将北京基因型分为 9 个群。VNTR 图谱为 3327533-42435-86 的菌株为中心菌株。我们采用同样的聚类分析软件处理 2000 年中国结核病流行病学抽样调查获得的 441 株结核分枝杆菌菌株的 IS6110 RFLP, spoligotyping 的分型结果, 确立其中心菌株(资料未发表)。中心菌株即为此群中有代表性的菌株, 该中心菌的确定为以后进行北京基因型结核分枝杆菌的深入研究提供了试材。

目前细菌已进入将其表型、遗传型和系统发育信息综合起来进行分类鉴定的时期。遗传信息来源于细菌中的核酸(DNA 和 RNA); 系统发育信息也属于遗传信息的范畴, 但它特指那些被看作是系统发育进化时钟的核酸序列^[15]。结核分枝杆菌的基因分型方法很多, 但主要为前面提到的三种方法。北京基因型概念的提出和深入研究就是以基因分型为核心的结核分子流行病学广泛应用的产物。但是鉴于北京基因型结核分枝杆菌的耐药性强和在全球的广泛流行, 而采用上述的理论和方法又无法加以明确解释。恰好北京基因型结核分枝杆菌在遗传进化上具有单源性的特征, 由此将其定义为北京分化支并进行了以系统发育为核心的亚分群工作。Kremer 等^[16]对荷兰、越南、中国香港 3 个地区共 1023 株北京分化支结核分枝菌株的研究发现, 非典型北京菌株/典型北京家族菌株的比例为 202/821, 且两个亚型与患者的 BCG 接种状态及耐药性存在联系($P < 0.05$)。在耐药性方面, 发现非典型北京菌株与 INH 耐药、多耐药(MDR)有关。在 BCG 接种人群中典型北京家族菌株的比例(210/265)高于非典型北京菌株(55/265) ($P < 0.05$)。但在年龄 > 75 岁的患者中, 非典型北京菌株的比例(10/22)明

显高于其他年龄组($P < 0.05$), 由此可以推测 BCG 对非典型北京菌株具有负选择压力, 即 BCG 疫苗不能保护对抗典型北京家族菌株。本研究发现 W 菌/典型北京家族菌株为 82 株, 占北京分化支的 93.2% (82/88), 所占比例明显, 较 Kremer 等^[16]的结果为高($P < 0.05$)。2 个亚群在不同年龄组患者和耐药谱的分布上差异无统计学意义($P > 0.05$)。分析上述结果可能与不同地区或样本量较小有关。准确地回答我国北京分化支两个亚群的比例, 与 BCG 接种、年龄和耐药等因素的关系对于解释我国 BCG 疫苗的保护程度和耐药产生的原因, 确定下一步研究疫苗的方向和研发新药至关重要。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [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] Li WM, Wang SM, Li CY, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in China: a nationwide random survey in the year 2000. *Inter J Tuberc and Lung Dis*, 2005, 9: 1314-1319.
- [4] 梅建, 沈鑫, 查佳, 等. 上海市 2000-2002 年 91 株结核分枝杆菌分子流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 2005, 26:707-709.
- [5] 李卫民, 王苏民, 裴秀英, 等. 京、沪、宁三省市(区)结核分枝杆菌 DNA 指纹的应用研究. *中华流行病学杂志*, 2003, 24:381-383.
- [6] Kurepina N, Likhoshvay E, Shashkina E, et al. Targeted hybridization of IS6110 fingerprints identifies the W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains among clinical isolates. *J Clin Microbiol*, 2005, 43:2148-2154.
- [7] Kremer K, Betty KYA, Peter CWY, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping. *J Clin Microbiol*, 2005, 43:314-320.
- [8] Brosch R, Gordon SV, Marmesse M, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*, 2002, 99:3684-3689.
- [9] Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, et al. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. *PNAS*, 2004, 101:4871-4876.
- [10] Plikaytis BB, Marden JL, Crawford JT, et al. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:1542-1546.
- [11] Tsolaki AG, Gagneux S, Alexander SP, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 2005, 43:3185-3191.
- [12] 沈国妙, 查佳, 徐琳, 等. 结核分枝杆菌散在分布重复单位基因分型法的应用研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28: 292-296.
- [13] Goyal M, Saunders NA, Drobniewski FA. Specificity of IS6110 based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:1224-1226.
- [14] 黄继翔, 惠明, 齐东梅, 等. 新型数值分类软件 X-Cluster 的开发及应用. *微生物学通报*, 2006, 33:118-120.
- [15] Colwell RR. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio: numerical taxonomy of vibrio cholerae, vibrio parahaemolyticus, and related vibrio species. *J Bacteriol*, 1970, 104: 410.
- [16] Kremer K, MJ van der Werf, Betty KYA, et al. Typical and atypical strains of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype have different levels of association with BCG vaccination and drug resistance. *J Clin Microbiol* (Accepted).

(收稿日期:2007-01-25)

(本文编辑:张林东)