

# 山东地区结核分枝杆菌临床菌株基因型特征研究

邓云峰 张延安 郑建礼 景辉 王燕 王海英 马欣 刘志敏

**【摘要】** 目的 探讨山东地区结核分枝杆菌临床分离菌株的基因型特征,评估不同基因型分布对于耐药结核菌近期传播的影响。方法 在山东地区选取 13 个结核病防治机构作为监测哨点收集临床分离菌株和相关信息,应用分枝杆菌散在重复单位(MIRU)技术分析结核分枝杆菌 DNA 多态性。结果 1 年的研究期内共获得 558 株结核分枝杆菌,对 12 个 MIRU 位点进行检测共产生 143 个基因型,其中成簇基因型 66 个,成簇率 86.2%。74.6% 的菌株属于北京家族,177 个(31.7%) 菌株属于山东基因型。耐多药菌株的近期感染估计值明显低于敏感菌株。结论 山东地区结核分枝杆菌具有明显的基因多态性,山东基因型菌株在人群中具有较强的传播能力。

**【关键词】** 结核,分枝杆菌;流行病学;基因分型;耐药性

**Study on molecular characteristics regarding DNA genotype of *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains in Shandong** DENG Yun-feng, ZHANG Yan-an, ZHENG Jian-li, JING Hui, WANG Yan, WANG Hai-ying, MA Xin, LIU Zhi-min. Shandong Provincial Chest Hospital, Jinan 250013, China  
Corresponding author: DENG Yun-feng, Email: yfdeng@126.com

This work was supported by a grant from the Medical Scientific Research Foundation of Shandong Province, China(No. 2005JW036, No. 2009HW077)

**【Abstract】 Objective** To establish the molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* and on factors influencing the recent transmission of drug resistant isolates in Shandong. **Methods** *Mycobacterium tuberculosis* isolated from active pulmonary tuberculosis patients of 13 counties were genotyped by mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) methods. **Results** 12 loci of MIRU were detected in 558 isolates and a total of 143 MIRU patterns were confirmed. 66 isolates had distinct patterns, and 481 (86.2%) strains were in clusters. Shandong cluster included 177 strains with 74.6% of the isolates belonged to Beijing family. The recent transmission index of multi-drug resistance strains was in lower level, comparing to the susceptible strains. **Conclusion** Our results showed that the Shandong cluster isolates had capacities of facilitating person-to-person transmission and high level of drug resistance.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Epidemiology; Genotyping; Drug resistance

近年来,随着分子生物学技术的进步,结核分枝杆菌的基因分型鉴定技术越来越成熟,深入研究结核病分子流行病学传播规律已经成为可能<sup>[1]</sup>。为了研究我国山东地区结核病传播的基因型特征、近期感染的影响因素和耐药菌的传播规律,本研究建立分枝杆菌散在重复单位(MIRU)和差异区 105 缺失检测(RD105)等技术方法<sup>[2,3]</sup>,对山东地区临床分离菌株进行初步分析。

## 材料与方 法

### 1. 菌株来源:2005 年 7 月 1 日至 2006 年 6 月 30

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.03.020

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(2005JW036, 2009HW077)

作者单位:250013 济南,山东省胸科医院

通信作者:邓云峰,Email: yfdeng@126.com

日,山东省 13 个结核病监测哨点共收集 598 株结核分枝杆菌,对其中的 558 株结核分枝杆菌提取 DNA 后进行基因型分析,使用“病例信息报告卡”和“病人风险评估表”收集病例基本信息。558 株菌株分离自 558 例结核病患者,其中男性 428 例,女性 130 例,平均年龄 48 岁(17~85 岁)。

2. 主要试剂:改良罗氏培养基为本实验室自制,结核分枝杆菌药物敏感性试验采用间接比例法<sup>[4]</sup>。Achromopeptidase(破壁酶)和 Proteinase K(蛋白酶 K)购自德国 Merck 公司;使用常规酚/氯仿抽提法提取结核分枝杆菌 DNA<sup>[2]</sup>。TaqDNA 聚合酶、dNTP、100 bp DNA Ladder Marker 以及正反引物由上海申能博彩生物科技有限公司提供。

3. 基因分型:参照文献设计 MIRU 12 个位点<sup>[5]</sup>

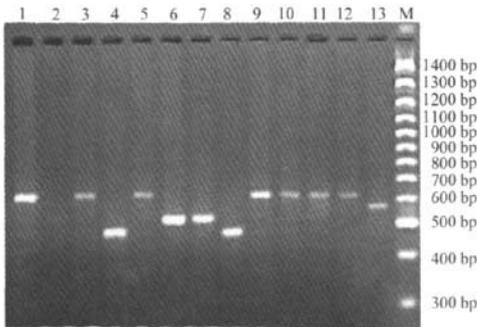
和 RD105<sup>[3]</sup> 正反向引物序列。PCR 总反应体积是 30 μl, 反应物质包括 0.6 μl DNA 标本, 0.15 μl TaqDNA 多聚酶, 21.0 μl 双蒸水, 3.0 μl 10 × PCR buffer, 4.8 μl 1.25 mmol/L dNTP, 以及正反向引物各 0.225 μl。使用 GeneAmp 9700 PCR 扩增仪进行扩增; 循环条件: 95 °C 预热 15 min, 95 °C 30 s、65 °C 30 s、72 °C 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。24 位点的退火温度是 55 °C, 其他反应条件同上。扩增产物在 2.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 使用 100 bp Ladder 做指示标记。

4. 统计学分析: 使用 Microsoft Excel 软件进行基本数据整理, 使用 WHO 的结核病耐药监测软件 SDRTB4 进行药物敏感性分析。MIRU 等位基因的多态性分析使用 Mazars 等<sup>[6]</sup> 的计算公式,  $h=1-\sum x_{i2} [n/(n-1)]$ 。使用由法国巴斯德研究所和德国国家结核病参比实验室共同开发的 MIRU-VNTR plus(1.0.7) 在线数据库和统计分析软件进行基因型聚类分析<sup>[7]</sup>。

### 结 果

1. RD105 分析: 对 558 株结核分枝杆菌的 DNA 标本采用 RD105 分析法进行基因分型, 经过判断, 416 株属于北京家族, 占 74.6%, 另外 142 株属于非北京家族。

2. MIRU 位点的基因多态性: 558 株结核分枝杆菌的 MIRU 基因分型结果显示, 在 12 个 MIRU 位点中, 位点 26 显示多态性最高, 多态性系数 ( $h$ ) 为 0.67 (图 1)。位点 31、10、39、40、27、4 显示中等程度的多态性 ( $h \geq 0.30$ ), 分别为 0.54、0.51、0.47、0.50、0.38 和 0.36; 位点 16、23、2、20 显示较低多态性 ( $h \leq 0.30$ ), 分别为 0.27、0.15、0.06、0.02 和 0.01; 位点 24 只有 1 种等位基因。



注: M: 100 bp DNA Ladder; 1 ~ 13: 不同结核分枝杆菌菌株

图 1 山东省不同结核分枝杆菌 MIRU 26 位点多态性检测结果

3. 基因型聚类分析: 558 株结核分枝杆菌菌株通过 MIRU 方法共被分为 143 种不同的基因型, 其中独特型 77 个, 占 53.8%。66 个成簇基因型中 40 个 (60.6%) 属于北京家族。成簇的菌株 481 株, 成簇率 86.2%, 簇的范围为 2 ~ 177, 最大的簇包含 177 株菌株, 此最大基因型编码为 223325173533, 称为 “Shandong cluster” (山东基因型)<sup>[8]</sup>。将 143 个 MIRU 基因型输入到 MIRU-VNTR plus 数据库中进行 UPGMA 聚类分析 (相似性系数 = 0.1), 可获得 12 个宗谱, 其中 110 个基因型包含在 2 个较大的宗谱内 (分别占总数的 21.7% 和 55.2%), 其余 33 个基因型分属于 10 个宗谱。结果显示, 山东地区的结核菌株既存在明显的优势大宗谱, 也存在具有遗传多样性的小宗谱。

4. 基因型与耐药的关系: MIRU 基因分型法在北京家族菌株中的成簇率高于非北京家族, 分别为 91.2% 和 76.3%, 山东基因型属于北京家族。北京家族菌株耐药性为 19.5%, 明显高于非北京家族菌株 (6.6%), 差异有统计学意义 ( $\chi^2=11.39, P<0.01$ )。成簇菌株的耐药性为 17.3%, 略高于独特基因型的菌株 (11.7%), 差异无统计学意义 ( $\chi^2=1.49, P>0.1$ )。92 株耐药菌株属于 35 个基因型, 其中成簇基因型 26 个, 成簇菌株 83 个, 成簇率 90.2%。466 株敏感菌株属于 126 个基因型, 其中成簇基因型 58 个, 成簇菌株 398 个, 成簇率 85.4%。耐药菌株的成簇率高于敏感菌株的成簇率, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=8.763, P<0.01$ )。在 66 个成簇基因型中, 有 35 个全敏感基因型, 5 个全耐药基因型。其中, 222325183533 基因型对异烟肼和链霉素耐药, 223322172523 和 223326173533 基因型对链霉素耐药, 223325153534 和 223325164533 基因型对异烟肼耐药。

5. 近期感染估计: 基因型完全相同的成簇菌株被认为是近期感染的结果, 通过 MIRU-VNTR 基因型分析可以计算出近期传播指数 (recent transmission index, RTI), 从而进行近期感染估计<sup>[9]</sup>。估计 72.7% 的全敏感菌株的传播是由于近期感染引起的, 而耐药菌株的近期感染估计值为 46.7%, 远远低于其他类型菌株。北京家族的近期感染危险性高于非北京家族 (表 1)。

### 讨 论

本研究发现 558 株结核分枝杆菌临床分离株通过 MIRU 方法可以分为 143 个基因型, 包括 77 个 (53.8%) 独特基因型和 66 个 (46.2%) 成簇基因型。成

表1 山东省结核分枝杆菌近期感染估计

类型	病例数	成簇病例数	簇的数量(c)	$RTL_{-1} = (n_c - c) / n$
家族类型				
北京家族	416	368	43	78.1%
非北京家族	142	113	26	61.3%
耐药类型				
全敏感	466	398	59	72.7%
其他耐药	77	69	23	59.7%
耐多药	15	14	7	46.7%

簇基因型由2~177个菌株组成,共包括481个菌株,成簇率为86.2%(481/558)。样本的成簇率是评价基因分型技术功效的重要指标<sup>[5]</sup>。本研究所得数值高于IS6110-RFLP(79%)和Spoligotyping(76%)两种方法的结果,而在另一项国际化的大样本研究中,MIRU和Spoligotyping的成簇率分别为23%和55%<sup>[3]</sup>。由此证明,除外方法学本身的差别,样本量大小和样本来源区域也是影响基因分型方法分辨率的因素。

MIRU和RD105都是以PCR为基础的方法,简单快速,剪操作性强,适用于对批量菌株进行基因型鉴定分析。本研究参考文献方法分别合成MIRU-VNTR技术的12对引物进行检测,发现MIRU的各个位点在基因分型中并不具有同等的功效。在本研究中,MIRU的2、23和24位点分别只出现了2、2和1的拷贝数。MIRU 4、10、26、31、39位点的分辨能力较高。RD105缺失检测对北京家族的鉴定,与被称为金标准的Spoligotyping技术的一致率达到100%,且操作简便、费用低廉<sup>[10]</sup>。本研究中,通过RD105检测发现74.6%(416株)的结核分枝杆菌属于北京家族,与我们之前的研究数据基本一致<sup>[8]</sup>。

有不少研究发现,北京家族菌株与耐药有关。在俄罗斯,北京家族菌株耐利福平率为69%,耐多药率为43%。但是,在北京家族菌株占优势的亚洲,很少有研究发现北京家族菌株与耐药有关,甚至发现北京家族菌株更不易耐异烟肼<sup>[11]</sup>。本研究显示,北京家族菌株的耐药性(19.5%)显著高于非北京家族菌株,而山东基因型菌株作为北京家族的主要成员,其耐药性水平与北京家族相近。通过对416例北京家族菌株和122例非北京家族菌株进行比较后发现,北京家族菌株与患者胸部X线片的病变范围及有无空洞没有相关性。本研究中发现的全敏感基因型和全耐药基因型有待于进一步研究验证。

应用基因分型技术作为分子生物标志进行不同地区感染菌间的亲缘关系比较,是近几年来结核病流行病学的热点。在挪威和瑞士进行的分子流行病学研究结果发现,成簇菌株的比例仅为16%~17%<sup>[11]</sup>,提示结核病近期传播并不严重。尽管发达

国家整体发病率较低,但是在一些特定地区或人群中结核病的近期传播还是相当严重。如在丹麦、纽约、旧金山和荷兰的研究发现,38%~49%为成簇菌株,表明在这些地区近期感染远高于原先估计的10%<sup>[12]</sup>。而在疫情严重的发展中国家,结核病主要是由于近期感染所致,成簇病例的比例高达60%以上。本研究显示,山东地区结核病近期感染估计值达到60.6%,耐多药菌株的近期感染最小估计值也达到46.7%,说明结核病疫情较为严重。因此建议,在有条件的地区逐步建立结核病分子流行病学监测体系<sup>[13]</sup>,深入研究结核病流行和传播的特点,揭示耐药结核病的流行规律,对我国的结核病控制策略有效实施有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report. WHO/HTM/TB/2006.362. Geneva: WHO, 2006.
- [2] van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol, 1993, 31: 406-409.
- [3] Tsolaki AG, Gagneux S, Pym AS, et al. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3185-3191.
- [4] Chinese Medical Association. Guideline of Clinical Technology/Fascicule for Tuberculosis. Beijing: People's Military Medical Press, 2004: 1. (in Chinese)  
中华医学会. 临床技术操作规范·结核病分册. 北京: 人民军医出版社, 2004: 1.
- [5] Supply P, Magdalena J, Himpens S, et al. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. Mol Microbiol, 2000, 269: 991-1003.
- [6] 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 Sci USA, 2000, 98: 1901-1906.
- [7] Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, et al. Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2692-2699.
- [8] Ma X, Wang HY, Deng YF, et al. rpoB gene mutations and molecular characterization of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Shandong province, China. J Clin Microbiol, 2006, 44: 3409-3412.
- [9] Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. N Engl J Med, 1994, 330: 1703-1709.
- [10] Liu JH, Christine P, Yolande H, et al. A new method for the identification of the "Beijing family" strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Microbiol Immunol, 2008, 28(2): 172-175. (in Chinese)  
刘敬华, Christine P, Yolande H, 等. 一种鉴定结核分枝杆菌"北京家族"菌株的新方法. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(2): 172-175.
- [11] Barun M, Natalia EK, Pablo JB, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. Clin Microbiol Rev, 2006, 19: 658-685.
- [12] Rad ME, Bifani P, Martin C, et al. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. Emerg Infect Dis, 2003, 9: 838-845.
- [13] Dong HY, Liu ZG, Zhao XQ, et al. Application of spoligotyping and MLVA analysis in genotype studies of *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Epidemiol, 2007, 28(3): 268-272. (in Chinese)  
董海燕, 刘志广, 赵秀芹, 等. 间隔区寡核苷酸分型和多位点可变数量串联重复序列分析在结核分枝杆菌基因分型中的应用. 中华流行病学杂志, 2007, 28(3): 268-272.

(收稿日期: 2009-09-24)

(本文编辑: 尹康)