

# 天津市北京基因型结核分枝杆菌流行特征及与耐药表型关系研究

巨韩芳 王擷秀 李桂莲 谢彤 赵德福 李尚伦 李敬新 赵慧 穆成

**【摘要】** 目的 了解北京基因型结核分枝杆菌在天津市人群中的分布、流行特征及其与耐药表型的关系。方法 收集2008年1月至2009年6月天津市结核病控制中心和10个区(县)结核病防治机构肺结核患者中初次分离培养的结核分枝杆菌656株及患者管理信息、临床信息和实验室信息。菌株对利福平、异烟肼、链霉素和乙胺丁醇的药物敏感性试验采用比例法。应用多重PCR法鉴定北京和非北京基因型菌株,并分析北京基因型菌株与耐药表型的关系。结果 本研究中菌株的总耐药率为26.98%,耐多药率为6.25%。北京基因型菌株600株(91.46%),非北京基因型56株(8.53%),其分布与天津市户籍( $\chi^2=4.26, P=0.039$ )有关,未见与耐药表型间有明显相关性。结论 北京基因型菌株是天津市的主要流行株,感染北京基因型结核分枝杆菌的天津市户籍患者的比例明显高于本地区流动人口患者,但尚未发现北京和非北京基因型菌株之间在耐药方面有明显的差异。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 北京基因型; 耐药

**Characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* genotype and the relationship between Beijing genotype and drug-resistant phenotypes in Tianjin** JU Han-fang<sup>1</sup>, WANG Xie-xiu<sup>2</sup>, LI Gui-lian<sup>1</sup>, XIE Tong<sup>2</sup>, ZHAO De-fu<sup>1</sup>, LI Shang-lun<sup>1</sup>, LI Jing-xin<sup>1</sup>, ZHAO Hui<sup>1</sup>, MU Cheng<sup>1</sup>. 1 Tianjin Center for Tuberculosis Control, Tianjin 300041, China; 2 Tianjin Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: WANG Xie-xiu, Email: wjsttigo@126.com

This work was supported by a grant from the AIDS and Viral Hepatitis Prevention and Control Projects for the National "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2008ZX10003-009).

**【Abstract】** Objective To explore the distribution and characteristics on genotype of *Mycobacterium tuberculosis* and the relationship between Beijing genotype and drug-resistant phenotypes in Tianjin city. Methods 656 clinical strains were collected from Tianjin Center for Tuberculosis Control and ten other Tuberculosis Institute in Tianjin from January 2008 to June 2009. Information regarding administration, clinical as well as laboratory findings of patients were collected. Proportion method was adopted to detect the susceptibility on four anti-tuberculosis drugs, namely streptomycin (SM), isoniazid (INH), rifampicin (RFP) and ethambutol (EMB). Both Beijing and non-Beijing genotypes were differentiated by multiplex PCR. The relationship between Beijing genotype and drug-resistant phenotypes was analyzed. Results In this study, the overall resistance rate of MTB was 26.98%, with multidrug-resistant rate was 6.25%. Among 656 MTB strains, 600 isolates (91.46%) belonged to Beijing genotype. There was significant difference between Beijing and non-Beijing genotype ( $\chi^2=4.26, P=0.039$ ) among the Tianjin household registered population. Concerning the drug resistance, there was no significant difference between the two groups. Conclusion Beijing genotype strains were the predominant one in Tianjin. The proportion of people infected with the Beijing genotype strains in Tianjin household registration of patients was significantly higher than the proportion of patients in the floating population in the same region. Results from the statistical analysis did not reveal any statistically significant association between Beijing genotype and drug resistance.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Beijing genotypes; Drug resistance

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.02.003

基金项目: 国家“十一五”艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目(2008ZX10003-009)

作者单位: 300041 天津市结核病控制中心(巨韩芳、李桂莲、赵德福、李尚伦、李敬新、赵慧、穆成); 天津市疾病预防控制中心(王擷秀、谢彤)

通信作者: 王擷秀, Email: wjsttigo@126.com

北京基因型结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 已在全球广泛传播, 这可能与该类菌株的毒力高、传播能力强、能够逃脱卡介苗的免疫保护、更易突变并产生耐药甚至耐多药 (multidrug-resistant, MDR) 等因素有关<sup>[1]</sup>。不同国家和地区北京基因型 MTB 的流行特征各有不同, 在中国和周边的一些国家和地区, 北京基因型菌株均占有较高的比例<sup>[2]</sup>, 但北京基因型与耐药表型的关系研究至今尚无定论。本研究旨在了解北京基因型 MTB 在天津市人群中的分布、流行特征及其与耐药表型的关系。

### 材料与方法

1. 菌株来源: 2008 年 1 月至 2009 年 6 月从天津市的结核病控制中心 (包括和平区、河北区、红桥区、河东区、南开区) 及另外 10 个区 (县) (包括津南区、河西区、塘沽区、大港区、西青区、蓟县、宁河区、东丽区、北辰区和汉沽区) 结核病防治机构肺结核患者中初次分离培养的 MTB 临床分离菌株 656 株, 排除 MTB 和非结核分枝杆菌以及一人多菌。H37Rv 标准菌株购自中国药品生物制品检定所。

2. 患者资料收集: 来自天津市结核病控制管理信息系统、病历和实验室分枝杆菌分离培养登记本中的结核病管理信息、临床信息和菌株实验室信息。656 例肺结核患者中初治患者为 568 例, 复治患者为 88 例。

3. 药物敏感性试验: 所有菌株均采用“世界卫生组织/国际防痨与肺部疾病联合会”推荐的比例法, 对 4 种一线抗结核分枝杆菌药物链霉素、异烟肼、利福平和乙胺丁醇进行药敏试验, 药敏培养基购自珠海贝索生物技术有限公司。

4. 菌株基因组提取: 采用十六烷基三甲基溴化铵法, 从改良罗氏培养基中挑取 1 菌环结核菌溶于 500  $\mu$ l TE 缓冲液中, 经 80  $^{\circ}$ C, 60 min 灭活后提取基因组 DNA。菌体裂解后释放的基因组 DNA 经酚-氯仿法抽提后溶于 50  $\mu$ l 灭菌去离子水中。

#### 5. 北京基因型和非北京基因型 MTB 的鉴定:

(1) 引物的选择: 采用经改进的多重 PCR 方法鉴定北京及非北京基因型菌株。PCR 引物参照文献 [3, 4] 并根据其基因特点设计 2 对引物, 北京基因型上游引物为: 5'-TTC AAC CAT CGC CGC CTC TAC-3' 和下游引物为: 5'-CAC CCT CTA CTC TGC GCT TTG-3' (GenBank AF390039), 非北京基因型上游引物为: 5'-GAT CGC TTG TTC TCA

GTG CAG-3' 和下游引物为: 5'-CGA AGG AGT ACC ACG TGG AG-3' (GenBank BX842581), 扩增片段长度分别为 393 bp 和 570 bp。

(2) PCR 体系的建立: 采用 25  $\mu$ l 体系, 引物终浓度为 0.44  $\mu$ mol/L, DNA 模板为 10~100 ng, 2  $\times$  MasterMix 12.5  $\mu$ l。PCR 反应条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

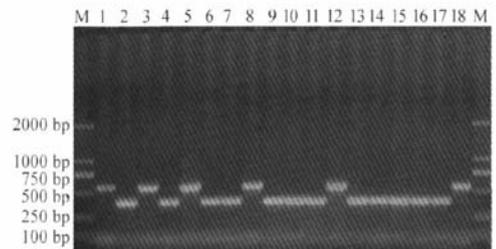
(3) 多重 PCR 方法的建立: 将 H37Rv 和已知的北京基因型临床分离株基因组混合后作为模板, 同时用北京及非北京基因型混合引物进行多重 PCR 扩增。为防止交叉污染, 每次试验均设置阴性对照。

6. 统计学分析: 所有数据录入用 SPSS 15.0 软件。计数资料组间比较采用四格表或 R  $\times$  C 列表, 经  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  作为判断差异是否有统计学意义的依据。

### 结 果

1. 菌株基本情况: 656 株 MTB 中 479 株全敏, 177 株耐药。耐药株中 MDR 菌株 41 株, 耐链霉素菌株 116 株, 耐异烟肼菌株 110 株 (包括 MDR), 耐利福平菌株 52 株 (包括 MDR), 耐乙胺丁醇菌株 33 株。

2. 多重 PCR 鉴定: 656 株菌中北京基因型 MTB 为 600 株 (91.46%), 非北京基因型 MTB 为 56 株 (8.54%), 见图 1。



注: M: 分子量标记 (DL2000); 1, 18: H37Rv 标准菌株, 为非北京基因型 MTB, 570 bp; 2, 4, 6, 7, 9~11, 13~17: 临床菌株, 为北京基因型 MTB, 393 bp; 3, 5, 8, 12: 临床菌株, 为非北京基因型 MTB, 570 bp

图 1 多重 PCR 方法鉴定北京基因型 MTB 电泳结果

3. 北京基因型 MTB 的流行特征: 北京及非北京基因型 MTB 在性别、年龄、初复治、胸片空洞数量、受累肺野数、患者职业分布、症状出现季节差异、不同区 (县) 的菌株来源未发现差异有统计学意义, 但两者在户籍上的差异有统计学意义,  $P < 0.05$  (表 1)。656 例肺结核患者中共 496 例 (75.61%) 为天津市户籍人口, 160 例 (24.39%) 为非天津市户籍人口 (表 2)。

表1 天津地区北京及非北京基因型MTB感染者特征

分组	基因型		χ <sup>2</sup> 值	P值
	北京	非北京		
性别			1.840	0.175
男	417(92.46)	34(7.54)		
女	183(89.27)	22(10.73)		
年龄(岁)			5.487	0.483
10~	36(85.7)	6(14.3)		
20~	173(92.0)	15(8.0)		
30~	70(87.5)	10(12.5)		
40~	101(90.2)	11(9.8)		
50~	101(93.5)	7(6.5)		
60~	50(94.3)	3(5.7)		
70~	69(94.5)	4(5.5)		
户籍			4.257	0.039
常住人口	460(92.74)	36(7.26)		
流动人口	140(87.50)	20(12.50)		
受累肺野个数			2.462	0.117
1~5	531(90.92)	53(9.08)		
6	60(96.77)	2(3.03)		
肺空洞			0.173	0.678
无	409(91.09)	40(8.91)		
有	186(92.08)	16(7.92)		
结核病治疗史			1.061	0.303
初治	517(91.02)	51(8.98)		
复治	83(94.32)	5(5.68)		
症状出现季节			4.992	0.172
春	220(93.2)	16(6.8)		
夏	170(90.4)	18(9.6)		
秋	109(94.0)	7(6.0)		
冬	101(87.1)	15(12.9)		
职业分布			11.161	0.132
干部	46(85.2)	8(14.8)		
工人	37(90.2)	4(9.8)		
家务待业	159(95.2)	8(4.8)		
离退人员	89(95.7)	4(4.3)		
民工	56(87.5)	8(12.5)		
农民	113(90.4)	12(9.6)		
学生	45(86.5)	7(13.5)		
其他	55(91.7)	5(8.3)		
菌株来源			11.322	0.333
结核病控制中心	424(91.0)	42(9.0)		
结核病防治机构				
河西	37(94.9)	2(5.1)		
塘沽	32(94.1)	2(5.9)		
汉沽	2(50.0)	2(50.0)		
大港	19(95.0)	1(5.0)		
东丽	4(80.0)	1(20.0)		
西青	14(93.3)	1(6.7)		
津南	44(89.8)	5(10.2)		
北辰	5(100.0)	0(0)		
宁河	7(100.0)	0(0)		
蓟县	12(100.0)	0(0)		

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比(%)

表2 656例天津地区北京及非北京基因型MTB感染者户籍分布

户籍	病例数	构成比(%)	户籍	病例数	构成比(%)
中国			辽宁	5	0.76
天津	496	75.61	甘肃	4	0.61
河北	28	4.27	江苏	4	0.61
黑龙江	26	3.96	陕西	4	0.61
山东	10	1.52	湖南	3	0.46
内蒙古	10	1.52	山西	3	0.46
河南	9	1.37	浙江	3	0.46
吉林	9	1.37	贵州	2	0.30
四川	9	1.37	江西	2	0.30
湖北	8	1.22	青海	1	0.15
福建	6	0.91	新疆	1	0.15
重庆	6	0.91	韩国	2	0.30
安徽	5	0.76	合计	656	100.00

4. 北京基因型MTB与耐药表型的关系:未发现北京基因型MTB与耐药有关。此外,非北京基因型MTB未见耐乙胺丁醇菌株(表3)。

表3 天津地区北京及非北京基因型MTB耐药分布

耐药表型	基因型(%)		χ <sup>2</sup> 值	P值
	北京	非北京		
总例数	600(100.00)	56(100.00)	-	-
全敏	435(72.50)	44(78.57)	-	-
耐药	165(27.50)	12(21.43)	0.958	0.328
MDR	39(6.50)	2(3.57)	0.417	0.518
链霉素	108(18.00)	8(14.29)	0.614	0.433
异烟肼	103(17.17)	7(12.50)	0.901	0.343
利福平	50(8.33)	2(3.57)	1.083	0.298
乙胺丁醇	33(5.50)	0(0)	-	-

注:同表1

### 讨 论

根据北京基因型菌株基因组中Rv2816和Rv2819序列缺失的特点,Hillemann等<sup>[4]</sup>在Warren等<sup>[5]</sup>采用2次PCR反应的研究基础上,采用多重荧光定量PCR一步法完成了北京和非北京基因型的鉴定,结果证实与标准的Spoligotyping方法一致率达到100%,然而由于荧光定量PCR仪的使用,使得该方法在基层实验室中的开展受到了限制,因此本研究采用改进的多重PCR反应使用普通PCR仪,一步法鉴定北京和非北京基因型MTB,经实验表明,该方法与Spoligotyping方法的结果一致率也为100%<sup>[3]</sup>。因此,该方法适用于北京基因型鉴定。

本研究发现,天津市91.46%的MTB为北京基因型,已成为全国北京基因型MTB流行最严重的地区之一。本研究中占24.39%的非天津市户籍结核

患者分布在河北、黑龙江、山东、内蒙古等 22 个省(自治区),其中 2 例来自韩国,其感染北京基因型 MTB 的比例明显低于天津市户籍人口,差异具有统计学意义,这也说明天津市的北京基因型 MTB 较其他省市传播更广。

未发现北京和非北京基因型 MTB 在患者性别、年龄、初复治、胸片空洞数量、受累肺野数、治疗史、职业分布、症状出现季节差异、不同区(县)的菌株来源的差异有统计学意义,原因可能是北京基因型菌株所占的比例过大,非北京基因型菌株仅有 56 株。该结果表明,北京基因型 MTB 是天津市的主流株。有研究发现耐药与北京基因型无关<sup>[6,7]</sup>,也有研究北京基因型与耐药有关<sup>[8-10]</sup>。本研究未发现北京基因型与任意一种药的耐药或耐多药有关。除北京基因型外,常见的非北京基因型家族还有很多,如 East African-Indian (EAI) 家族、Haarlem (H) 家族、Latin American and editerranean (LAM) 家族和 Central Asian (CAS) 家族,不同国家和地区北京基因型菌株所占的比例差异较大。此外,北京基因型本身也有许多亚型,有研究表明不同人群中北京基因型 MTB 亚型分布不同,与耐药的关系也不同<sup>[11,12]</sup>。因此耐药或耐多药结核病是否与北京基因型在不同国家和地区人群中所占的比例以及在这些人中北京基因型亚型的分布有关,还需要进一步研究证实。

### 参 考 文 献

[1] Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, et al. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA*, 2005, 293 (22): 2726-2731.

[2] Singh UB, Arora J, Suresh N, et al. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in India. *Infect Genet Evol*, 2007, 7(4): 441-448.

[3] Zhao DF, Xie T, Ju HF, et al. Identification of Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* using multiplex PCR. *J Chin Antituberculosis Association*, 2010, 32 (6): 315-317. (in Chinese)

赵德福, 谢彤, 巨韩芳, 等. 利用多重 PCR 方法快速鉴定结核分

枝杆菌北京基因型菌株. *中国防痨杂志*, 2010, 32(6): 315-317.

[4] Hillemann D, Warren R, Kubica T, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(2): 302-306.

[5] Warren RM, Victor TC, Streicher EM, et al. Patients with active tuberculosis often have different strains in the same sputum specimen. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(5): 610-614.

[6] Liu FY, Liu ZG, Wang XW, et al. Genotyping study of 208 *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangxi with Spoligotyping. *Chin J Zoonoses*, 2007, 23 (12): 1226-1230. (in Chinese)

刘飞鹰, 刘志广, 王喜文, 等. Spoligotyping 对广西地区 208 株结核分枝杆菌临床分离株的基因分型. *中国人兽共患病学报*, 2007, 23(12): 1226-1230.

[7] Wang XM, Lu B, Liu ZW, et al. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Zhejiang province with spacer oligonucleotide typing and multiple loci variable number tandem repeat analysis. *Chin J Zoonoses*, 2008, 24(12): 1090-1094. (in Chinese)

王晓萌, 吕冰, 柳正卫, 等. Spoligotyping 和 MLVA 用于 71 株浙江省结核分枝杆菌临床分离株基因分型的初步研究. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(12): 1090-1094.

[8] European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(5): 736-743.

[9] Affolabi D, Anyo G, Faïhun F, et al. First molecular epidemiological study of tuberculosis in Benin. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(3): 317-322.

[10] Sun YJ, Lee AS, Wong SY, et al. Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2007, 11(4): 436-442.

[11] Hanekom M, van der Spuy GD, Streicher E, et al. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(5): 1483-1490.

[12] Nikolayevskyy VV, Brown TJ, Bazhora YI, et al. Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from the southern Ukraine. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(2): 129-138.

(收稿日期: 2010-09-10)

(本文编辑: 万玉立)