

# 北京、广东、宁夏三地结核分支杆菌 DNA 指纹的应用研究

李卫民 王苏民 裴秀英 刘忠泉 钟球 钱明 赵冰 端木宏谨

**【摘要】** 目的 分析“北京家族”结核分支杆菌,从分子流行病学角度探讨北京、广东及宁夏三地结核分支杆菌的分布特征。方法 采用 Gel compare 4.1 软件对来自三地的 206 株结核分支杆菌的插入序列 IS6110 DNA 指纹图谱进行数字化,经互联网与世界结核分支杆菌 DNA 指纹库进行相似性比较,同时应用该软件对上述菌株行聚类分析,构建标准的结核分支杆菌 Spoligotyping(间隔区寡核苷酸分型法)DNA 指纹方法,用  $\chi^2$  检验比较不同组别肺结核病人临床分离菌株成簇率的差别,同时计算相对危险度(OR)。结果 206 株结核分支杆菌的 IS6110 DNA 指纹图谱与 DNA 指纹图谱库相比较,未发现相同者。56.8%(117/206)的结核分支杆菌 IS6110 DNA 指纹相似值在 1.00~0.65 之间,且它们的 Spoligotyping 指纹图谱均与“北京家族”结核分支杆菌相一致,分组统计显示:男性组与女性组、年龄  $\geq 42$  岁组与  $< 42$  岁组成簇率之间差异有显著性( $P < 0.05$ ),OR 值为男性 4.43,95% CI 0.94~28.76;  $< 42$  岁为 5.06,95% CI 1.00~34.34。其他各组之间差异无显著统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 “北京家族”结核分支杆菌在三地呈较高水平的流行,结核分支杆菌在男性和  $< 42$  岁人群中的传播频率较女性和  $\geq 42$  岁人群为高,且男性和  $< 42$  岁可能是三地结核病近期传播的危险因素。利用结核分支杆菌的 DNA 指纹图谱和互联网技术,可以实现结核分支杆菌传染源全球范围的追踪。

**【关键词】** 结核杆菌;DNA 指纹法;聚类分析

**DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Beijing, Guangdong and Ningxia** LI Wei-min\*, WANG Su-min, PEI Xiu-ying, LIU Zhong-quan, ZHONG Qiu, QIAN Ming, ZHAO Bing, DUANMU Hong-jin. \*Beijing Tuberculosis and Chest Tumor Institution, Beijing 101149, China

**【Abstract】 Objective** To explore the epidemic distribution of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Beijing, Guangdong and Ningxia, and to determine *M. tuberculosis* strains of the “Beijing Family”. **Methods** Two hundred and six IS6110 DNA fingerprinting patterns of *M. tuberculosis* strains from three provinces (city) were transferred to digital data, compared with the world *M. tuberculosis* DNA fingerprinting database, and then clustered by Gel compare 4.1 software. The clustering values in different patients with tuberculosis were compared by  $\chi^2$  test. Risk factors for recent transmission were calculated using odd ratios. **Results** No *M. tuberculosis* strains were found the same as those of DNA fingerprint database. 56.8% (117/206) fingerprinting patterns of *M. tuberculosis* shared by least two-thirds of the IS6110 fragments and their Spoligotyping fingerprinting patterns were consistent with those of *M. tuberculosis* strains of the “Beijing Family”. There were significant differences between female and male, different age groups ( $< 42$  years old) and older ( $\geq 42$  years old) ( $P < 0.05$ ). Odd ratio was 5.06 in the group younger than 42 years old (95% CI 1.00-34.34) and was 4.43 (95% CI 0.94-28.76) in males. **Conclusion** *M. tuberculosis* strains of “Beijing Family” were popular in Beijing, Guangdong and Ningxia. Men and younger age group ( $< 42$ ) were shown to be infected by identical strains more often than women and older aged which might play an important role in the recent transmission of tuberculosis in these areas. IS6110 DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* could be used to trace the source of tuberculosis infection.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; DNA fingerprints; Cluster analysis

结核病是当今全球范围对人类最具威胁的

传染性疾病之一。随着分子生物学技术的发展,它与传统的结核流行病学相结合,形成新的结核分子流行病学。该学科能为结核病控制规划以及结核的临床治疗和基础研究提供较为科学的依据,是缓解目前结核病严峻局面的有利工具。其中结核的

作者单位:101149 北京市结核病胸部肿瘤研究所细菌免疫研究室(李卫民、王苏民、刘忠泉、赵冰、端木宏谨);宁夏回族自治区医学院(裴秀英);广东省结核病防治所(钟球、钱明)

DNA 指纹技术就是该学科的一个较典型范例<sup>[1]</sup>。结核分支杆菌基因组 DNA 上存在重复序列(例如 IS、DR 等)。这些重复序列与基因组 DNA 的多态性有关。因此,以这些重复序列( IS6110、DR)为基础的 DNA 指纹可以在菌株水平对结核分支杆菌进行鉴定,进而实现了该技术在结核流行病学中的应用。结核分支杆菌的 DNA 指纹可以分析其群结构特征。Van Soolingen 等<sup>[2]</sup>构建了来自中国和蒙古的结核分支杆菌的标准 DNA 指纹,分析发现“北京家族”株(Beijing Family)。结核分支杆菌 DNA 指纹的另一用途为依据其聚类分析得出的簇和成簇率,分析结核病的传染源和传播途径,筛选易患结核病的人群,计算影响结核病近期传播的危险因素<sup>[1]</sup>。本实验分析了来自北京市、广东省和宁夏回族自治区的 206 株肺结核患者临床分离的结核分支杆菌的标准 DNA 指纹图谱,现将分析结果报告如下。

## 材料与方法

1. 菌株 206 株结核分支杆菌于 1999 年 5 月至 2001 年 7 月分离自北京市结核病胸部肿瘤研究所、广东省结核病防治所、宁夏回族自治区结核病防治所的住院肺结核患者标本。其中北京 59 株,分别来自朝阳区 11 株、海淀区 8 株、东城区 7 株、丰台区 6 株、崇文区 5 株、西城区 2 株、远郊区 20 株;广东省 74 株,分别来自汕头 10 株、茂名 9 株、清远 9 株、广州 7 株、揭阳 7 株、江门 7 株、梅州 6 株、韶关 5 株、肇庆 4 株、河源 4 株、东莞 3 株、湛江 3 株;宁夏回族自治区 73 株,分别来自固原县 23 株、银川市 22 株、银北地区 12 株、银南地区 6 株、其他县市 10 株。

2. 标准结核分支杆菌 IS6110 限制性片段长度多态性(RFLP)DNA 指纹图谱:北京市<sup>[3]</sup>、广东省、宁夏回族自治区<sup>[4]</sup>的结核分支杆菌标准 IS6110 RFLP DNA 指纹图谱均按照 Van Embden 等<sup>[5]</sup>和专业网站<sup>[6]</sup>上推荐的方法在本实验室完成。

3. 标准的结核分支杆菌 Spoligotyping(间隔区寡核苷酸分型法)DNA 指纹方法的构建:以 DR 为基础的 Spoligotyping DNA 指纹方法参照 Goyal 等<sup>[7]</sup>推荐的方法。合成 43 种特异的 DR 间隔区短核苷酸序列,并将它们固定于 Biotyne C 膜上。PCR 扩增结核分支杆菌基因组 DNA 上的重复元件 DR 之间的序列,引物为 DRa 5'-GGTTTGGGTCTGA CGAC-3', DRb:5'-CCGAGAGGGACGAAAC-3',且

DRa 5'末端标记有生物素。将 PCR 产物与固定在 Biotyne C 膜上的短核苷酸序列杂交、显色,结果即为结核分支杆菌 Spoligotyping 的 DNA 指纹图谱。

4. 计算机分析:将每章附有内对照和外对照(Mt14323)的 IS6110 DNA 指纹图谱输入计算机,采用 Gel compar 4.1 进行处理,IS6110 限制性片段的移动与内对照相比较,以确定数字化的位置。将数字化的 206 株结核分支杆菌的 IS6110 DNA 指纹输入荷兰指纹库<sup>[8]</sup>,做相似性比较。在每章图谱的 IS6110 限制性片段的移动与内对照相比较的基础上,令每章膜的外对照指纹谱带完全匹配。分别将三地以及全部的结核分支杆菌的 IS6110 DNA 指纹行聚类分析,相似系数为 Dice 系数,聚类方法采用平均连锁法<sup>[1]</sup>。

5. 统计学分析 206 例肺结核患者按性别、年龄( $\geq 42$ 岁、 $< 42$ 岁)、痰涂片和初治或复治分组。采用 Gel compar 4.1 对每组患者分离的结核分支杆菌依据其 IS6110 DNA 指纹图谱进行分类(每组排除指纹图谱条带数低于 7 个的患者)。相似值从 1.00 ~ 0.90 定为 1 簇。 $\chi^2$  检验比较两组间成簇率的差别,同时作相对危险度(OR)<sup>[1]</sup>分析  $\alpha < 0.05$ 。

## 结 果

206 株结核分支杆菌的 IS6110 DNA 指纹图谱与位于荷兰的约含 6 000 株结核分支杆菌的 DNA 指纹图谱库相比较,未发现相同者。

对 206 株三地的临床分离结核分支杆菌菌株的 IS6110 DNA 指纹图谱进行聚类分析(图 1),相似值 1.00 ~ 0.65 之间的菌株可以归为三个大群,其中第一群菌株的 IS6110 拷贝数为 1,共 13 株;第二群菌株拷贝数为 15 ~ 20 个,共 117 株,占总数的 56.8% (117/206)。Spoligotyping 的 DNA 指纹方法鉴定第二群的结核分支杆菌,结果提示(图 2),该群菌株的 DNA 指纹图谱与“北京家族”株的特征指纹图谱一致。因此即分析它们为“北京家族”株。该家族菌株分别在三地结核分支杆菌菌株中所占的比例为:北京 79.66% (47/59)、广东 25.67% (19/74)、宁夏 67.12% (49/72)。

比较不同人群结核分支杆菌成簇率差别,男性组与女性组、年龄  $< 42$  岁组与  $\geq 42$  岁组之间差异有显著统计学意义 ( $P < 0.05$ )。其他各组之间差异无显著统计学意义 ( $P > 0.05$ )。计算 OR 值男性组为

4.43(95% CI 0.94 ~ 28.76); < 42 岁组为5.06(95% CI 1.00 ~ 34.34)(表1)。

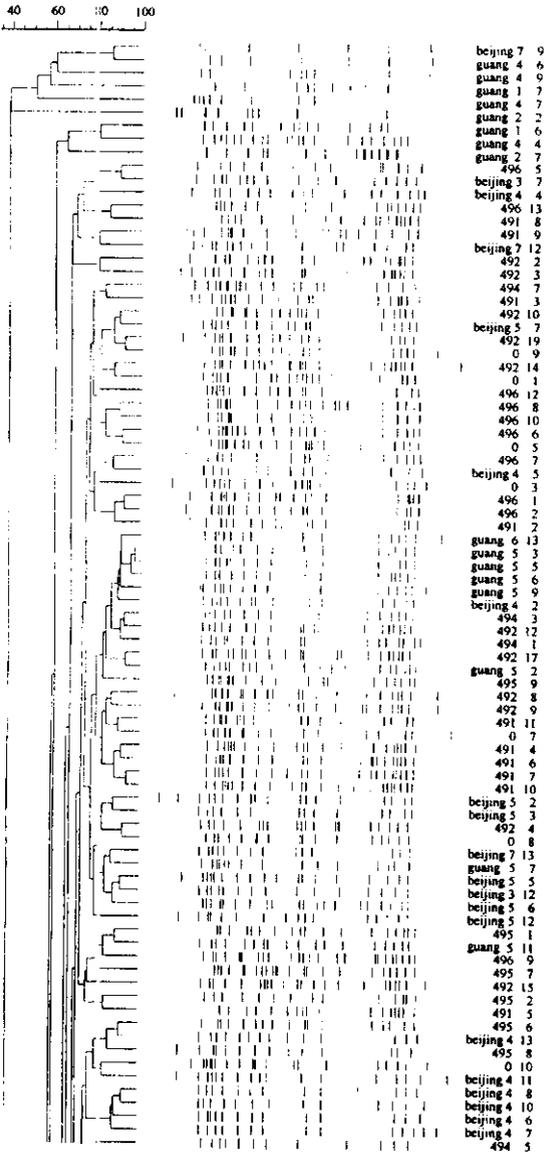


图1 206株临床分离结核分支杆菌菌株的IS6110 DNA 指纹图谱聚类分析结果

表1 不同组别病例对应的结核分支杆菌成簇率的比较

组别	成簇病例数 (>0.90)	非成簇病例数	P 值	OR 值 95% CI
性别			0.040	0.94 ~ 28.76
男	20	97		
女	2	43		
初治或复治			0.256	
复治	25	114		
初治	2	24		
年龄组(岁)			0.038	1.00 ~ 34.34
< 42	11	75		
≥42	2	69		
痰涂片			0.375	
阳性	27	120		
阴性	2	20		

结核流行病学的一个问题。本实验利用结核分支杆菌的 DNA 指纹图谱和互联网技术,进行了我国结核分支杆菌 DNA 指纹图谱与世界的 DNA 指纹图谱库的比较,虽未发现相同者,但是通过该途径可以实现结核分支杆菌传染源在全球范围的追踪。

在结核分支杆菌复合群的每一个菌株基因组 DNA 上存在多个直接重复区域(direct repeat, DR),并且发现数目变化很大,DR 间隔区(DR spacer)的 DNA 核苷酸序列不重复。以 DR 为基础的 Spoligotyping DNA 指纹鉴定方法就是利用结核分支杆菌复合群的每一个菌株的 DR 间隔区核苷酸序列的多态性来实现其在株水平上的鉴定。当插入序列 IS6110 的数目较少时,Spoligotyping DNA 指纹鉴定方法可以作为标准结核分支杆菌 IS6110 RFLP DNA 指纹方法的补充。同时因 Spoligotyping 鉴定“北京家族”结核分支杆菌呈特征的 DNA 指纹图谱(图2),所以其又专门用于快速鉴定“北京家族”株。

1995 年 Van Soolingen 等<sup>[2]</sup>曾对“北京家族”结核分支杆菌进行了定义,即采用标准的 Gel compar 分析软件分析结核分支杆菌 IS6110 RFLP DNA 指纹图谱, Dice 相似值 > 0.65,同时行 Spoligotyping DNA 指纹鉴定,具有特征的指纹图谱者(图2)。近年我国有关“北京家族”结核分支杆菌的报道较多,王苏民等<sup>[4]</sup>采用了聚类分析,但相似值未用 Dice 相似系数,裴秀英等<sup>[5]</sup>的报道未进行统计学分析;张立兴等<sup>[9]</sup>尽管采用了标准的 Gel compar 分析软件,但未进行 Spoligotyping DNA 指纹鉴定,本实验依据“北京家族”株的定义进行分析,因此结果准确性较高。Van Soolingen 等<sup>[2]</sup>还报道“北京家族”株在中国(主要是北京)、蒙古、中国台湾、韩国、前苏联和南非等国家和地区均有较高水平的流行。本项研究结果发

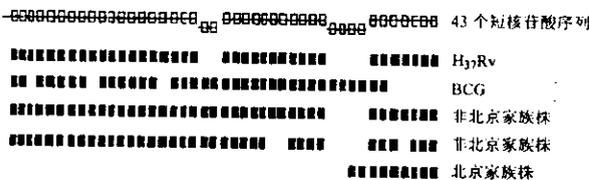


图2 结核分支杆菌以 DR 为基础的 Spoligotyping DNA 指纹鉴定结果

讨 论

追踪传染源和查证传播途径是长期困扰传统的

现该家族菌株在京、广、宁三地呈较高水平的流行(占总菌株的 56.8%),且北京、宁夏所占比例(79.66%、67.12%)较广东(25.67%)高。他们同时依据流行地区普遍接种 BCG 疫苗推测“北京家族”株的选择优势可能是由于 BCG 诱导的机体免疫保护性机制保护了这种基因型,而不能保护其他的“逃逸型”的结核分支杆菌基因型。由此很多文献已将“北京家族”改称为“北京基因型”(Beijing genotypes)。鉴于北京基因型结核分支杆菌在我国部分省市的流行程度较高,那么如果在今后的工作中能加大对该基因型菌株的基因组学、蛋白组学、免疫学和致病特征的研究,对我国的结核病工作可能会起到事半功倍的作用。

Gutierrez 等<sup>[10]</sup>和 Lelany 等<sup>[11]</sup>依据簇和成簇率的概念以及成簇即代表近期传播的理论将结核患者按性别、年龄( $\geq 42$ 岁、 $< 42$ 岁)痰涂片和初、复治分组,比较不同组别患者所对应的结核分支杆菌成簇率的差别,从而分析结核分支杆菌较易于传播的人群特征。本研究参照上述文献,采用回顾性研究的方法分析不同组别患者所对应的结核分支杆菌成簇(1.00~0.90)率的差别及 OR 提示结核分支杆菌在男性和 $< 42$ 岁人群中的传播频率较女性和 $\geq 42$ 岁人群为高,且男性和 $< 42$ 岁可能是造成结核病在三地近期传播的两个独立危险因素。该结果与国外<sup>[10-12]</sup>的报道基本一致。

总之,结核分支杆菌的 IS6110 RFLP DNA 指纹技术和以 DR 为基础的 Spoligotyping 的 DNA 指纹鉴定方法曾在结核的分子流行病学中发挥了积极的作用,但鉴于其样本用量大和方法烦琐等缺点,目前正被一些更高通量的方法所取代<sup>[13]</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 王苏民,李卫民. 结核分支杆菌基因组 DNA 指纹技术在结核病流行病学中的应用. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24:253-255.
- 2 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.
- 3 王苏民,李卫民,刘枫春,等. 结核分支杆菌 DNA 指纹技术及其应用研究. 中华检验医学杂志, 2001, 24:76-78.
- 4 裴秀英,王苏民,朱桂林,等. IS6110-限制性片段长度多态性 DNA 分型在结核分子流行病学研究中的应用. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25:18-20.
- 5 Van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol, 1993, 31:406-409.
- 6 <http://www.wadsworth.org/rflp/RFLP.html>
- 7 Goyal M, Saunders NA, Van Embden JDA, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by Spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol, 1997, 35:647-651.
- 8 <http://www.caontb.rivm.nl>
- 9 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.
- 10 Gutierrez MC, Vincent V, Aubert D, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. J Clin Microbiol, 1998, 36:486-492.
- 11 Lelany PG, Annabelle F, Sven EH. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. J Clin Microbiol, 1997, 35:2393-2397.
- 12 Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. Emerg Infect Dis, 2000, 6:302-306.
- 13 Philip S, Sarah L, Evgueni S, et al. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol, 2001, 39:3563-3571.

(收稿日期 2002-09-10)

(本文编辑:尹廉)

## · 会 讯 ·

### 第二届全国中青年流行病学工作者学术会议征稿启事

由中华预防医学会流行病学分会主办、深圳市预防医学会和深圳市疾病预防控制中心承办的“第二届全国中青年流行病学工作者学术会议(The 2nd National Symposium on Epidemiology for Younger Epidemiologists)”将于 2003 年 10 月 22~24 日在深圳特区召开。大会的主题是“宏观和微观并举”,将分为主题报告、大会和分会交流等形式,就流行病学理论、方法和应用、传染病和非传染病流行病学、分子和现场流行病学等领域的最新研究进展进行广泛学术交流,并尽力促成粤、港、澳等现场考察活动的实现。参会人员将授予中华预防医学会“国家级继续医学教育项目”学分。请按《中华流行病学杂志》稿约格式投稿,除全文外,请附 300~500 字中、英文摘要各 1 份,来稿及软盘请寄 518020 深圳市田贝一路 21 号 深圳市疾病预防控制中心流行病学科 张欣 收,或投寄 E-mail 信箱:szepi2003@21cn.com。截稿日期 2003 年 8 月 31 日。金秋鹏城展翅喜迎八方有识之士,微观宏观并举共创流行病学辉煌,欢迎投稿。