

中国部分地区 159 株结核分枝杆菌 临床分离株 MLVA-19 分型分析

吕冰¹, 刘梅², 李兆娜³, 刘志广¹, 赵秀芹¹, 万康林¹

摘要: 目的 初步了解中国部分地区结核分枝杆菌临床分离菌株数目可变串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTRs) 基因多态性特征。方法 采用多位点 VNTRs 分析 (multiple loci VNTRs analysis, MLVA) 技术, 随机选取 159 株中国部分地区结核分枝杆菌临床分离菌株, PCR 和琼脂糖凝胶电泳技术, 对结核分枝杆菌的 19 个 VNTRs 位点进行检测, 用 BioNumerics (Version 5.0) 软件进行结果分析, 数据结果与国际 MLVA 数据库 (<http://minisatellites.u-psud.fr>) 比对, 初步分析结核分枝杆菌 DNA 多态性特征。结果 159 株菌株大致被分成 4 个主要的簇, 其中 73.8% 的菌株为北京家族菌株, 其次为 H37Rv 相似菌株及在数据库中没有比对结果的一簇, 这一簇的 MLVA 特点是 ETRD > 3, MIRU10、MIRU27、MIRU39、MIRU40 及 Mtub21 位点结果为 22221, 与其他簇的菌株结果有比较明显的区别。可能是中国特有的菌株。另外发现与 BCG 相似的一簇。结论 本次研究中的中国结核分枝杆菌具有明显的 VNTR 基因多态性, 主要流行菌株为北京家族菌株, 可能存在中国特异的 VNTR 基因型。BCG 临床分离株的发现, 提示 BCG 疫苗相关病例可能成为值得关注的卫生问题。

关键词: 结核分枝杆菌; 多位点数目可变串联重复序列分析; 基因分型; 卡介苗

中图分类号: R52

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)05-0359-04

Analysis on genotyping of 159 strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated clinically in some areas of China with MLVA-19-Loci LV Bing*, LIU Mei, LI Zhao-na, LIU Zhi-guang, ZHAO Xiu-qin, WAN Kang-lin. *State Key Laboratory for Communicable Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: WAN Kang-lin, Email: wankanglin@icdc.cn

Abstract: **Objective** To investigate the polymorphic genetic characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) strains isolated in China based on variable number of tandem repeats (VNTRs). **Methods** Nineteen tandem repeat loci were used for typing 159 randomly selected strains of *M. tuberculosis* isolated in some areas in China. The loci were analyzed by PCR and agarose gel electrophoresis respectively. The polymorphic genetic characteristics of DNA fingerprinting of these strains were detected with the BioNumerics 5.0 software. The results of genotyping were compared with the Intel-database of MLVA (<http://minisatellites.u-psud.fr>). **Results** 159 strains of *M. tuberculosis* were divided into 4 main clusters, the majority belonged to Beijing family cluster (73.8%), followed by H37Rv-like strains, BCG-like strains, and a no-matched cluster compared with the Intel-database. The tandem repeats characteristics of no-matched strains was that the repeat number of ETRD > 3, MIRU10, MIRU27, MIRU39, MIRU40, and Mtub21 was 2, 2, 2, 2, 1 respectively, which had significant difference with the strains of other cluster and might be a peculiar strain in China. A BCG like cluster was found too. **Conclusion** Obvious genetic polymorphism for the strains of *M. tuberculosis* isolated in China was observed in this study, The major strains belonged to Beijing family. There might be peculiar strains in the strains of *M. tuberculosis* isolated in China. The detection of BCG-like strains indicated that the BCG vaccine related cases might be a public health problem which should be pay attention to.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; multiple loci variable number of tandem repeats analysis; genotyping; BCG

结核病目前仍然是危害人类健康的重要传染病

之一。传统的流行病学方法不能很好地揭示结核病的传播规律, 分子生物学与流行病学研究方法相结合产生的分子流行病学在这方面有着不可替代的优势。多位点数目可变串联重复序列分析 (MLVA, multiple loci VNTR analysis) 是利用基因组中特定位点上可变数目串联重复序列 (variable number of tandem repeats, VNTRs) 进行基因型分型。有研究发现结核分枝杆菌的全基因组序列中

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30771853)

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206; 2. 四川大学基础医学院与法学院; 3. 首都医科大学附属北京儿童医院

作者简介: 吕冰, 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事结核病研究工作

通信作者: 万康林, Email: wankanglin@icdc.cn

收稿日期: 2009-01-06

存在许多 VNTR 位点,但其侧翼序列具有高度保守性。被检测的菌株根据不同位点的 VNTR 重复单元的拷贝数的多少来进行数字化编码,然后利用相关软件通过计算机来对这些菌株进行自动分型^[1]。

本研究用 19 个 MLVA 位点对 159 株中国 8 地区的菌株进行分型研究,其 MLVA 数据结果与国际 MLVA 数据库比对,考察各簇型别同国际菌株的近似型别,以了解中国 8 地区菌株的主要流行分布和主要流行型,以及是否存在中国特殊型别,为建立中国的 MLVA 数据库打下初步的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 159 株结核分枝杆菌临床分离株, H37Rv 参考菌株及 2 株 BCG 疫苗株, 牛结核分枝杆菌和非洲结核分枝杆菌, 共 164 株均由中国疾病预防控制中心传染病所结核病实验室提供。159 株临床分离菌株采集于 2004-2006 年, 来源于北京、福建、甘肃、广西、河南、四川、新疆、西藏 8 个省、直辖市、自治区。每省菌株抽选大约 20 株, 抽样方法为单纯随机抽样, 各省的全部菌株编号, 用随机数字表抽取样本, 即菌株编号排序并同随机数字表中数字相关联, 取随机数字表中偶数相关联的菌株。

1.2 MLVA 分型方法 参照吕冰等^[2] MLVA 标准化方案及 MLVA 数据库^[3], 本研究采用 MLVA 数据库收录的 19 个 VNTR 位点 (ETRA, ETRB, ETRC, ETRD, ETRE, MIRU2, MIRU10, MIRU16, MIRU23, MIRU26, MIRU27, MIRU39, MIRU40, Mtub21, Mtub29, Mtub30, MTUB38, Mtub39, Qub11a) 对 164 株结核分枝杆菌进行分型分析。简要试验过程如下: 用沸水浴制备样本 DNA, 设计引物, 通过 PCR 扩增将以上各位点的序列扩增出来, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定大小, 计算 VNTR 位点重复次数, 其重复次数结果用 Bionumerics 软件分析, 并绘制聚类结果图。

1.3 Sopoligotyping 参照 Kamerbeek 等^[4] 报道的 Sopoligotyping 操作方法, 实验过程如下:

1.3.1 带有间隔寡核苷酸序列探针膜的制备 将 43 个直接重复序列 (DR) 位点的探针 (150 μ l 0.125 μ mol/L) 标记在 miniblotter 的狭缝中, 孵育 1 h, 用 2 \times SSPE/0.1% SDS 及 20 μ mol/L EDTA (pH 值

8.0) 洗膜。

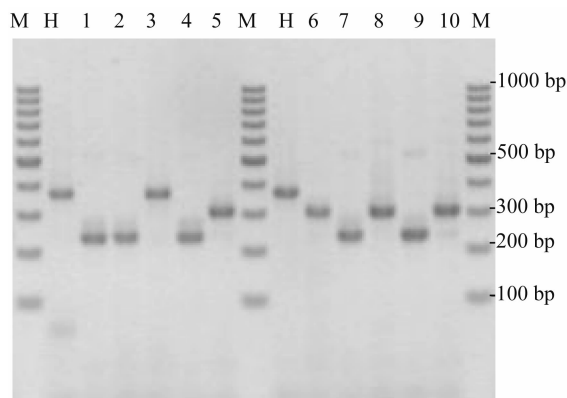
1.3.2 沸水浴制备样本 DNA 通过 PCR 扩增得到各菌株 43 个 DR 位点的序列。

1.3.3 杂交与检测 43 个位点的 PCR 产物与制备好的膜进行杂交并用化学发光法检测。

1.4 MLVA 结果数据库比对 在数据库中比对 MLVA 分型结果, 对 159 株结核分枝杆菌临床分离株及 5 株 H37Rv、BCG (2 株)、Bovis 和非洲分枝杆菌, 共 164 株进行分型研究, 了解菌株的大致型别分布。

2 结果

2.1 164 株结核分枝杆菌 19 个位点的 PCR 产物凝胶电泳结果 图 1 是 10 株结核分枝杆菌临床分离株的 Mtub38 位点的 PCR 产物凝胶电泳结果图。各菌株 PCR 结果各不相同, 表现了该位点的基因多态性。位点的 PCR 产物长度不同说明了位点重复次数的不同, 用 BioNumerics 软件计算出各个条带的长度, 可以计算出该位点的重复次数。



M: 核酸分子质量标准 (1000 bp ~ 100 bp); H: 结核分枝杆菌标准参照株 H37Rv; 1 ~ 10: 10 株结核分枝杆菌临床分离株

图 1 Mtub38 位点 PCR 产物的凝胶电泳图

Figure 1 Electrophoresis of PCR products of Mtub 38

2.2 164 株结核分枝杆菌 MLVA 结果聚类分析 用 Bionumerics 软件将 164 株菌株 MLVA 结果进行聚类。图 2 是 164 株菌株的 MLVA 结果的聚类图, 由图可见 164 株菌株大致被分成 4 个主要的簇, 图中用方框表示出 4 个主要的簇。其中绝大多数菌株 (121 株) 由于结果相同/相似而分到一簇当中, 图中用红色方框表示, 占总菌株数 73.8% (121/164), 成为 8 地区的优势菌株。

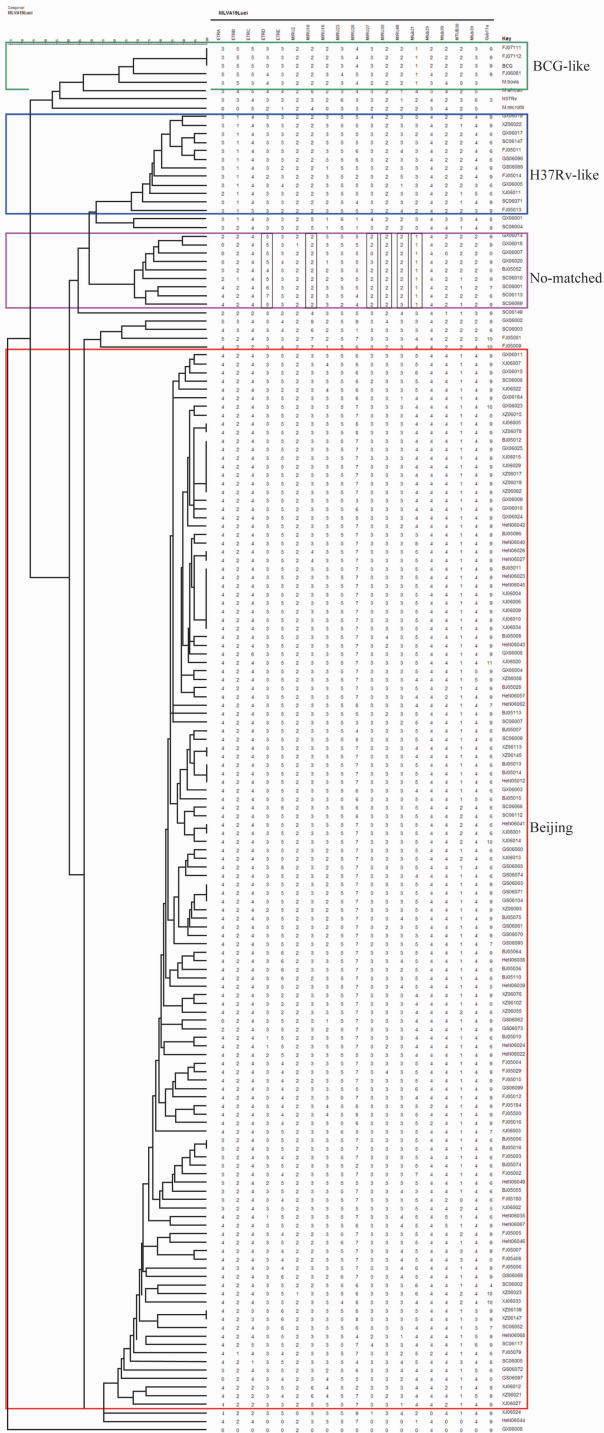
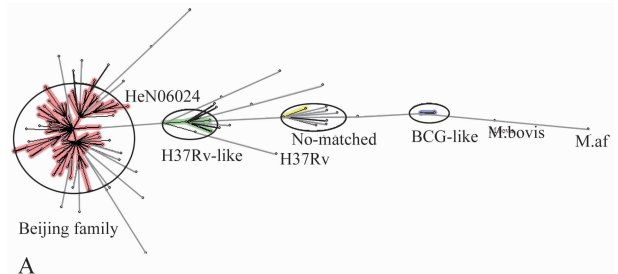


图 2 164 株结核分枝杆菌 MLVA 结果聚类图
Figure 2 MLVA clustering map of 164 *M. tuberculosis* strains

2.3 各簇的数据库比对结果 本实验的结果数据与数据库 (<http://minisatellites.u-psud.fr>) 收存的菌株 MLVA 结果比对后, 了解中国菌株的大致型别分布。本文用菌株 HeN06024 为例, 表示出菌株 MLVA 结果同国际数据库比对的结果, 见图 3, 结果表示与该菌株结果相似的菌株在数据库中有 3 个,

均分离自法国 (Pasteur 和 France), Spoligo 分型表示这 3 株均为北京家族 (BEIJ)。

本实验 159 株临床分离株中, 占菌株总数最多的簇为北京家族菌株, 其次是 H37Rv 近似的菌株和 BCG 近似菌株, 还有一簇在数据库中没有比对结果, 该簇的 MLVA 结果特点是 ETRD > 3, MIRU10、MIRU27、MIRU39、MIRU40 及 Mtub21 位点结果为 22221, 与其他簇的菌株结果有比较明显的区别 (图 2), 应该是中国特有的菌株。



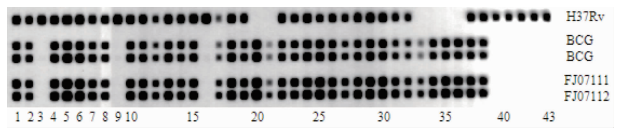
Results in the Mycobacterium tuberculosis 2002-2004 MLVA database

Key	Distance	strain	origin	group_spoligo	publications	Same MLVA	MLVA results																		
							A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O				
Mtub#172	4	#20001272	Pasteur	BEU	Le Flèche2002	none	4	2	4	3	5	2	3	4	5	7	3	2	3	6	4	4	0	4	6
Mtub#169	5	#991053	Pasteur	BEU	Le Flèche2002	none	4	2	4	3	5	2	3	4	5	7	3	2	3	6	4	4	0	4	9
Mtub#226	5	percy248	France	BEU	Le Flèche2002	none	4	2	4	3	5	2	3	3	5	7	3	3	1	4	4	0	4	14	

B. A. 164 株结核分枝杆菌的最小生成树图 B. 菌株 HeN06024 的数据库比对结果。结果表示与该菌株结果相似的菌株在数据库中有 3 个, 均分离自法国 (Pasteur 和 France), Spoligo 分型表示这 3 株均为北京家族 (BEIJ)。

图 3 164 株结核分枝杆菌分型聚类的最小生成树图及菌株 MLVA 数据同国际数据库比对结果 (以菌株 HeN06024 为例)
Figure 3 Mini-scan tree of 164 strains of *M. tuberculosis* and the MLVA result compared with Intel-database (strain HeN06024 was the example)

2.4 BCG-like 一簇的菌株 Spoligotyping 分型结果 图 4 为 2 株 BCG-like 一簇的结核分枝杆菌临床分离株 Spoligotyping 分型结果, 其结果同 2 株 BCG 的 Spoligotyping 结果相同。杂交阳性 (图上的黑点) 表示该菌株全序列中有该 DR 位点, 杂交阴性表示无该 DR 位点。



图下方为 1~43 个 DR 位点
图 4 BCG-like 菌株的 Spoligotyping 分型结果
Figure 4 Spoligotyping result of BCG-like strains

3 结论

多位点数目可变串联重复序列分析 (MLVA, multiple loci VNTR analysis) 是一种以 PCR 技术为基础的方法,它简单方便、分辨率高,结果容易分析,具有很高的可重复性,在实验室内和实验室间具有非常好的可比性,并能提供数字化的分型信息,适宜于进行大量样本和网络化分析^[1]。尽管国际上许多学者认为 MLVA 方法的分辨力不如 IS6110-RFLP^[5],但是也有更多的研究者从事于完善 MLVA 方法的研究。

本研究应用 19 个 MLVA 位点,对中国 8 地区(北京、福建、甘肃、广西、河南、四川、新疆、西藏)的菌株进行分型分析,分型结果同国际数据库比对,明确中国这 8 个地区主要的流行菌株为北京家族菌株(图 2),占总菌株数的 73.8%。北京家族菌株是 1995 年 van Soolingen 等^[6]首先报道的,这些菌株是在遗传上高度保守的菌株,也是在亚洲国家广泛传播的菌株,具有一定的选择优势,易呈克隆传播,在 *M. tb* 种系中构成一个大的分支^[7]。在某些情况下与多耐药性及 BCG 疫苗的接种有较大的相关性^[6]。鉴于北京家族菌株独特的地区分布、选择优势及克隆传播的能力,该种系菌株可能适应人类的进化,易于感染人类引起疾病^[8]。

本研究的 159 株结核分枝杆菌临床分离株分成主要的 4 个簇,除去最大的北京家族菌株外还有一簇实验结果与 H37Rv 菌株比较近似,和一簇在数据库中没有匹配结果,以及与 BCG 相似的一簇。关于在数据库中没有比对结果的一簇,其 MLVA 分型结果特点是 ETRD > 3, MIRU10、MIRU27、MIRU39、MIRU40 及 Mtub21 位点结果为 22221,与其他簇的菌株结果有比较明显的区别(图 1),应该是中国特有的菌株,在本研究中的 159 株结核分枝杆菌临床分离株中,这簇菌株共有 9 株,其中 4 株为药物敏感菌株,1 株为单耐药菌株(INH),4 株为多耐药菌株。从分离这些菌株的临床病例资料来看,9 例患者年龄 26~79 岁,6 例痰培养阳性,3 例为复发病例,接触史均不详。本次研究的抽样菌株比较少,还不能确定该簇菌株的耐药、治病力等特征与其他簇菌株有差别,关于这簇菌株的特征需要我们进一步的研究。

另外,BCG 相似的一簇菌株均分离自 3 岁以下的儿童,临床诊断均为肺结核。由于中国目前卡介苗已是计划免疫项目,在全国新生儿普种,在情况下的结核分枝杆菌感染,而且其致病菌的 MLVA

基因分型结果与卡介苗相似,Spoligotyping 分型结果完全相同,提示可能为卡介苗疫苗相关病例。近年湖北、郑州等地区有报道新生儿结核性淋巴结炎病例^[9,10],而本研究几株 BCG-like 菌株分子分型结果与卡介苗相似,并均来自儿童肺结核病例,还不同与新生儿接种卡介苗所致的淋巴结强反应,应为疫苗相关病例,由于病例的流行病学资料不十分详细,所以尚需要进一步的研究调查。

参考文献

- [1] Cha J, Gao Q. MIRU-a new genotyping methods for *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Chinese Journal of anti-tuberculosis*, 2005, 27(3):189-191. (in Chinese)
查佳,高谦. MIRU-新的结核分枝杆菌基因型分型方法简介[J]. 中国防痨杂志, 2005, 27(3):189-191.
- [2] Lv B, Pourcel C, Liu JH, et al. Establishment of the standard operation program of MLVA typing on *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2008, 29(9):919-924. (in Chinese)
吕冰, Pourcel C, 刘敬华, 等. 结核分枝杆菌多位点可变数目重复序列分型方法标准化程序的建立[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(9):919-924.
- [3] <http://minisatellites.u-psud.fr>
- [4] Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(4):907-914.
- [5] Kremer K, Au BK, Yip PC, et al. Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from HongKong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(1):314-320.
- [6] van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, et al. Predominance of a single Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Countries of East Asia [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(12):3234-3238.
- [7] Kurepina NE, Sreevatsan S, Plikaytis BB, et al. Characterization of the phylogenetic distribution and chromosomal insertion sites of five IS6110 elements in *Mycobacterium tuberculosis* non-random integration in the dnaA-dnaN region [J]. *Tubercle Lung Dis*, 1998, 79(1):31-42.
- [8] Yang BF, Xu B. The research progress of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2004, 25(2):178-180. (in Chinese)
杨本付, 徐颺. 结核分枝杆菌 W-北京家族菌株研究进展 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(2):178-180.
- [9] Gong XY, Liu QX, Shi TD. The handle report of 26 BCG vaccinate incident [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2007, 34(17):3361-3362. (in Chinese)
龚雪英, 刘启学, 史天东. 26 起卡介苗接种事故处理情况研究报告 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(17):3361-3362.
- [10] Song CL. The clinical observation on newborn infant lymphonode strong infection after BCG vaccinate [J]. *China Practical Medicine*, 2007, 2(18):72. (in Chinese)
宋春兰. 新生儿接种卡介苗致腋下淋巴结强反应的临床观察 [J]. 中国实用医药, 2007, 2(18):72.