

麻风分枝杆菌基因分型及其多个患者家庭内传播的研究

刘健 王峥 温艳 田秀君 陈小华 李桓英 翁小满

【摘要】 目的 探讨在特定地区和时期内采用多位点可变串联重复序列(VNTR)分析(MLVA)对麻风菌基因分型,以评价麻风病传播链。方法 从云南省丘北县2002-2006年收集的患者皮损中提取麻风菌DNA,采用AC9、6-7、GTA9、AT17、AC8a、AT15、AT18七个VNTR位点的MLVA基因分型,观察不同基因型与地理分布的关系;与现场流行病学调查结合,开展传播链的研究。结果 (1)系统发育树分析揭示:依据GTA9等位基因型的变化,可分为GTA9位点为9,11-13,15-26,>26的A、B、C、D和E菌株。A菌株的GTA9等位基因型均为9,命名为A株。A株聚集分布在该县北部,B株聚集分布在西北部,但C、D和E菌株基因型多变,散在分布。(2)该县北、西北部的5个高发家庭内的菌株为相同的A株。同一高发家庭内的患者,其菌株VNTR基因型一致或相似,但其他高发家庭之间的菌株基因型不相同。(3)在总菌株中,A菌株占有较高比例,且地理分布聚集,近期仍在传播。结论 无论从家庭内或较小区域内收集菌株的分型结果显示,VNTR基因分型适合麻风菌分型和短传播链的研究。优势菌株或聚集株均为高发家系中发现的,因此推测高发家系可能作为乡村中的麻风菌的疫源和传染源。但需要较长时期证实A菌株是否为优势株。

【关键词】 麻风病;分子流行病学;基因分型;传播链

Study on genotyping of *Mycobacterium leprae* and families with multi-cases LIU Jian, WANG Zheng, WEN Yan, TIAN Xiu-jun, CHEN Xiao-hua, LI Huan-ying, WENG Xiao-man. Capital University of Medicine Affiliated Beijing Friendship Hospital, Beijing Tropical Medicine Institute, Beijing 100050, China

Corresponding author: WENG Xiao-man, Email:wengxiaoman@sina.com

【Abstract】 Objective Multiple locus variable number-tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) had been proposed as a means of strain typing for tracking of source and studying the transmission chain of pathogens. However, empirical data for a defined population from scale and duration were lacking for studying the transmission chain of leprosy. **Methods** MLVA on 7 VNTR loci was applied to the strain typing on prevalent *Mycobacterium leprae* isolates collected from Qiubei county, Yunnan province during 2002-2006 in the study on the relationship between geographic distribution and genotypes of *M. leprae*. The strain typing, combined with conventional epidemiological investigation was performed to trace the transmission chain. **Results** (1) Phylogenetic analyses through application of PAUP 4.0, The *M. leprae* were grouped into A, B, C, D and E strains according to the allelic range 9, 11-13, 15-26 and >26 on the GTA9 locus. The strains with 9 copies on GTA9 locus, was named A. (2) Genotypes of strains from the five multi-case families located at North and North-West parts were similar and belonged to A strains. VNTR patterns of intra-family were identical or similar but not identical inter-family. (3) Not only A cluster appeared higher proportion in total isolates but also distributes cluster, indicating ongoing transmission from recent findings. **Conclusion** VNTR strain typing was suitable to trace the short chain of transmission in both small area and intra-families. Multi-case families might constitute epidemic foci and source of *M. leprae* in villages, causing the predominant strain or cluster which tends to be those identified in multi-case families and resulted in the spreading of leprosy. A long-term study was underway to reveal whether A strain was predominant strain and to observe the evolution of *M. leprae* in this spatially and temporally defined endemic population.

【Key words】 Leprosy; Molecular epidemiology; Genotyping; Transmission chain

基金项目:NIH(5R01AI63457-3)和美国 HEISER 基金会资助

作者单位:100050 首都医科大学附属北京友谊医院 北京热带医学研究所

通讯作者:翁小满,Email:wengxiaoman@sina.com

麻风病是麻风分枝杆菌感染引起的慢性传染病。WHO 推荐的治疗麻风病的联合化疗方案 (MDT) 实施 20 余年来, 在原高流行地区, 如印度、巴西以及我国云贵川的某些地区, 发现率并无明显下降。这提示仅依靠 MDT 并不能实现控制麻风病的目标^[1]。至今, 有关麻风病的传染源、传播途径及与宿主相互作用等传播机制仍不清楚, 均阻碍了控制麻风病目标的实现。麻风菌在体外培养不成功, 以及既往对麻风菌基因组缺乏了解, 而认为麻风菌不能分型, 从而影响了麻风病传播链的流行病学研究进展。麻风菌基因组测序成功后^[2], 确立麻风菌的可变串联重复序列 (VNTR) 位点^[3]。多位点 VNTR 分析 (MLVA) 的菌株分型被认为是追踪传播链的研究工具^[4]。但是, 目前仍缺乏在一定区域内, 采用 VNTR 菌株分型研究传播链的经验。

云南省文山州是我国麻风病高流行区。该州丘北县的某些乡近 5 年的麻风病发现率仍高达为 9.7/10 万, 已是我国制定控制麻风病指标的近 20 倍。1998-2000 年在丘北县 2 个高发村开展的实验流行病学研究发现, 普通人群麻风菌的特异性 PGL-1 血清抗体为 30%, 28% 的家庭内接触者的鼻分泌物携带麻风菌。因此提示这一地区麻风病的流行仍很严重^[5]。为进一步研究麻风病的传播模式, 本研究在选择足以具有鉴别和区分菌株的 VNTR 位点后^[6], 采用麻风菌 MLVA 基因分型与现场流行病学调查相结合的方法, 对丘北县 2002-2006 年间收集的 84 株麻风菌分型。试图发现与地理分布相关的聚集株 (cluster) 或优势菌株; 评价 MLVA 为基础的基因分型对研究麻风病传播链的价值, 以便为追踪麻风病的传染源和制定控制麻风病对策提供理论依据。

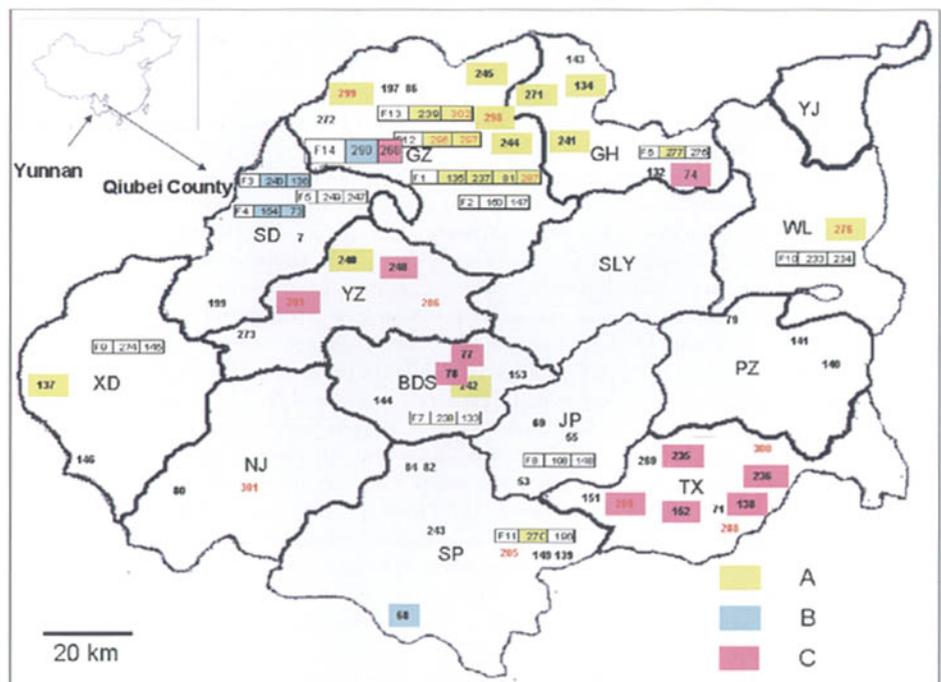
材料与方 法

1. 研究现场: 云南省

文山州丘北县位于云南省的东南部, 是我国麻风病流行最高的县之一。2004 年全县总人口 45.2 万人。共辖 3 镇 11 乡 (图 1, 用汉语拼音的大写字母代表各乡名)。交通条件极差, 人口流动不便。麻风病在丘北县流行久远, 截至 2005 年底, 全县共累计发现麻风病 1654 例。近 5 年来, 每年平均发现患者 20~30 例。位于丘北县北、西北部的官寨 (GZ)、戈寒 (GH)、舍得 (SD) 3 个高发乡的病例数占全县总例数的 43% (36/84)。

2. 研究人群: 诊断依据于临床、细菌学和组织病理学检查诊断, 按 Ridley-Joplin 的五型分类^[7]。2002-2006 年发现的 84 例新发患者中 TT 4 例、BT 24 例、BB 3 例、BL 48 例、LL 5 例。签署知情同意后, 在患者的活动性皮损部位, 使用 6 mm 的钻孔器取皮肤活检组织 1 份, 并一分为二, 1 份固定在 70% 乙醇中, 用于麻风菌株的基因分型, 1 份固定在 10% 中性甲醛中用于病理学检查。

3. 研究方法: 采用麻风菌 MLVA 基因分型与相结合的方法。以 7 个 VNTR 位点 (AC9、6-7、GTA9、AT17、AC8a、AT15、AT18) 为基础的菌株分型。位点以标准菌株 (TN) 在某位点有连续数个碱基的重



注: 乡名称以各乡的汉语拼音的首字母命名; 黑色数字代表 2002-2006 年发病的患者, 红色数字代表 2006 年新发患者, 方框代表高发家庭; A 菌株标为黄色; B 菌株为蓝色; C 菌株为粉色

图 1 2002-2006 年云南省丘北县分离 84 株麻风菌的地理分布

复数表示。对患者家庭内、外的麻风病接触史等进行现场流行病学调查,以确定患者菌株的基因型与传染源、传播链之间的关系。

4. 麻风菌 DNA 提取和 Nested-PCR: 采用 Qiagen 试剂盒提取皮肤组织中的麻风菌 DNA。PCR 扩增 7 个位点的特异性片段。反应总体积 50 μ l, 其中 10 \times PCR 缓冲液 5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 4 μ l, dNTP (2.5 μ mol/L), 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ l, 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ l, Q-solution 5 μ l, 模板 2 μ l。如果第一轮 PCR 阴性, 采用 Nested 的外部引物, 再扩增。表 1 为 PCR 引物序列, 部分同文献[3, 8]。

5. PCR 产物的测序: PCR 产物经过 2% 琼脂糖凝胶电泳, 在确定扩增出目的片段后, 送北京鼎国生物公司测序, 以确定各位点的等位基因型。

6. 位点多样性分析: 从下载 The Microsatellite Tool Kit(18, Park, 2001) 软件, 用于计算位点的频率及平均位点的多样性, 位点多样性 $H = 1 - \sum x_i^2$, x_i 是第 i 个等位基因型的频率。

7. 系统进化树分析: 为了描述丘北县 69 株麻风菌之间的关系, 应用 PAUP 4.0 软件的简约法对 VNTR 分型结果进行系统发育树分析。如果有 $\geq 50\%$ 的一致性, 就可以在进化树中描述, 再应用 Stepwise Mutation 模式, 可认为在每/各个位点, 如果有一个拷贝数的变化, 则认为一个突变发生。

结 果

1. 84 株麻风菌株 MLVA 各位点的等位基因型和多样性分析: 根据每个位点的等位基因型、等位基因型频率及位点多样性结果, 7 个位点的多样性分

析显示, AC9、AC8a、6-7 具有有限程度多样性, 等位基因型仅为 6 种, AT17、AT15、AT18 具有中等程度多样性, GTA9 具有高度程度的多样性。鉴别力从 AC9、AC8a、6-7、AT17、AT15、AT18 至 GTA9 依次增大。

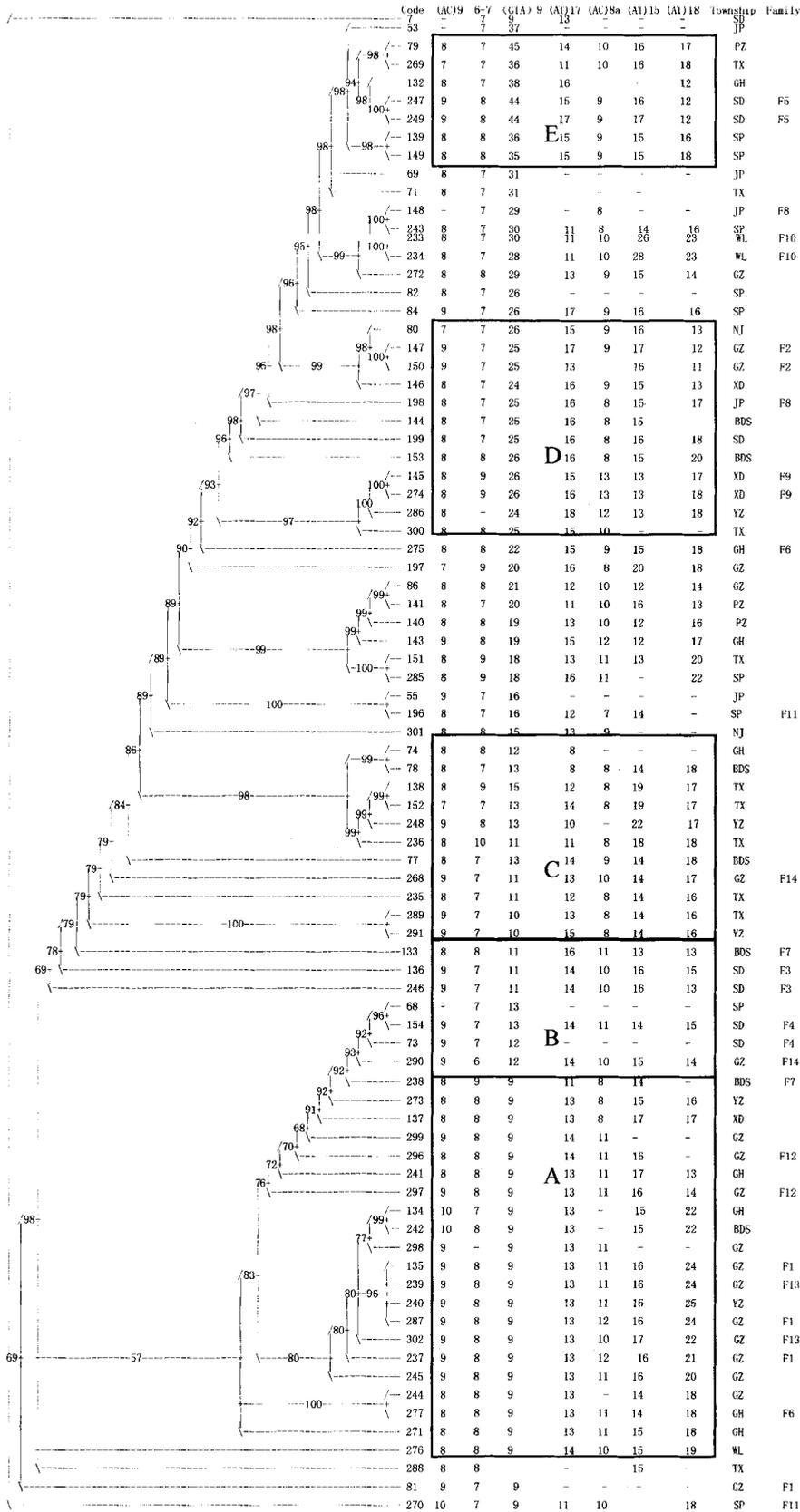
2. 系统进化树分析: 应用 PAUP 4.0 软件的简约法, 对 84 株中具有 7 个位点分型结果进行系统发生树分析(图 2)。结果提示, 该地区菌株似乎依赖 GTA9 位点的等位基因型的变化, 分为 A、B、C、D、E 5 组菌株(图 2 中以方框表示)。GTA9 有 24 个等位基因型(9~45)。GTA9 等位基因型为 9 个拷贝的菌株, 主要分布在 A 组; 等位基因型为 11~13 的菌株在 B、C 组, 15~26 的菌株在 D 组, >26 的菌株在 E 组。因此, 本研究将 A 归入一个聚集株(图 1 中的黄色部分), C(粉色部分)、D、E 组比 A、B 组的基因型具有较高的多态性。

3. 患者/分离菌株的地理分布: 2002 - 2006 年间新发患者 84 例, 2006 年 1 - 10 月发现病例为 15 例, 这 84 例 7 个位点的分型结果见表 2。图 1 显示 84 例麻风患者的地理分布。2002 - 2006 年在 SLY 和 YJ 乡未发现新发患者, 在 NJ 乡只发现 2 例患者。从图 1 中可以明显看出麻风病患者的分布具有明显的不均衡性, 1/3 以上的患者(35/84)分布在北部和西北部的 3 个乡(分别为 GH、GZ、SD)。此外, 30 例来自 14 个有 2 个或以上患者的高发家庭, 提示该病存在明显的家庭聚集性(高发家庭编号分别为 F1~14, 在图 1 中分别标在方框内)。

综合图 1 和图 2 分析显示, 麻风菌株基因型与地理分布相关。为 A 菌株的患者主要分布在丘北县的北部 2 个乡(GZ、GH), B 菌株(图中蓝色部分)

表 1 Nested-PCR 检测 7 个位点的外部 and 内部引物及扩增片断大小及退火温度

位点	上游引物序列 (5' ~ 3')	下游引物序列 (5' ~ 3')	位置 (kb)	基因位置	片段大小 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
AC9 外部	AGCGCCCGTTGTCGATAGA	TGCTGGTGAACCCGCGATA	1452.469~1452.701	ML1227~1228	236	60
AC9 内部	GACTGTAAAGTTCAGCCGAGG	GACTGGATGTCGGCAACC			146	58
6-7 外部	GCCATCGTTGTCGGTTCATC	CGGAGGAGGTGGGTACGGT	1816.849~1816.893	ML1505/+	268	60
6-7 内部	TACIAACGGGCGGTATCGCTCAC	CAGTGCCTGCCAGGTTTTG			152	58
GTA9 外部	AGCCITAGTCGCGCAGATG	TCCGCTGTCCGTCCGCTGA	2583.301~2584.200	ML2172~2173	307	60
GTA9 内部	CGCAGATGCAACCGATCACC	TGCCITTTGCTTGACACTACCTG			161	58
AT17 外部	CCTTAACCCATTGAGCGAAG	GCCGCTAAGGTGCATGATA	2597.735~2597.832	ML2183/-	398	57
AT17 内部	TCTCCAACATGCTGCGACA	GTACAGCGCCTGATCGAA			181	60
AT15 外部	GATCAATATGCGGGTTGGCG	AGCAAGCAGGTCCAGCAGTG	948.935~948.964	ML0798~0799	199	60
AT15 内部	CAATATCGGGTTGGCGCTTCTG	CCGTCTGGCTCGATGGCTGGATT			168	60
AC8a 外部	GCAGTCTTATCGGGTTTC	GGGTTGCGGCTCTACAT	2210.760~2211.149	ML1285/-	300	50~52
AC8a 内部	GTGTIACGCGGAACCGGCA	CCATCTGTTGGTACTACTGA			124	55
AT18 外部	CGTGCGTCTGTGTAGGC	GACGTGGCAACATCGAAGTT	984.471~984.700	ML0830/-	230	58~60
AT18 内部	CCGCTIAGCAGTCAGCATCGA	CCCGACTCGCGAAGCGAAAC			120	60



分布在西北的 SD 乡。而 C、D、E 组散在分布在除北、西北部的其他乡，如 TX、SP、JP、PZ。但是少数 A、B 菌株仍有分布在其他乡。2006 年 GZ 乡发现的 7 例新发患者，6 例为 A 株，1 例为 B 株。

4. 高发家系内菌株基因型及其对传播的影响：从表 3 可以看出，每一家系内的患者，诊断或收集菌株的间隔时间多在 1-3 年。在 14 个高发家庭中，有 10 个家庭 (F1~5, F9, F10, F12~14) 内的菌株基因型，在 4 个位点是一致或高度相似，提示有一个共同的传染源近期在家庭内传播。但 F6~8 和 F11 家庭的菌株其基因型有差异。大部分家庭中分离的菌株含 AT 或 TA 的位点，其等位基因型有较大的变化。

以官寨 (GZ)、舍得 (SD)、戈寒 (GH) 乡为例，GZ 乡有 5 个高发家庭，其中 F1 与 F12、F13 家内患者均为麻风菌基因型一致的 A 株。估计该菌株的传播，不仅使其同村邻居患者 (#298、#244) 基因型，而且其他乡村的患者 (#240、#237、#245 和 #299) 的细菌基因型也为 A 株 (图 2)。GZ 乡的 F14 家庭居住紧邻 SD 乡，其菌株基因型与 SD 乡的 F3、F4 家内患者细菌基因型一致或相似，为 B 株 (图 2)。

图2 84 株麻风菌 VNTR 基因型的系统进化树分析

表2 84 株麻风菌 7 个位点 VNTR 分型结果

标本号	诊断日期	临床分型	查菌		VNTR 位点							
			皮肤涂片	病理	AC9	6-7	GTA9	AT17	AC8a	AT15	AT18	
7	2001.12	BT	1.0	1+	Neg	7	9	13	No	No	No	No
53	2003.08	BT	1.16	1+	Neg	7	37	No	No	No	No	No
55	2003.08	BT	0.6	2+	9	7	16	No	No	No	No	No
68	2003.04	BB	1.6	2+	Neg	7	13	No	No	No	No	No
69	2002.11	BT	0.8	1+	8	7	31	No	No	No	No	No
71	2002.09	BT	0.0	1+	8	7	31	No	No	No	No	No
73	2003.02	BL	3.8	4+	9	7	12	No	No	No	No	No
74	2003.03	BL	1.6	3+	8	8	12	8	No	No	No	No
77	2002.07	LL	4.4	5+	8	7	13	14	9	14	18	18
78	2003.02	BL	3.8	4+	8	7	13	8	8	14	18	18
79	2002.08	BL	0.4	2+	8	7	45	14	10	16	17	17
80	2002.03	BL	3.6	4+	7	7	26	15	9	16	13	13
81	2002.03	BL	3.4	4+	9	7	9	No	No	No	No	No
82	2002.01	BL	2.6	4+	8	7	26	No	No	No	No	No
84	2002.03	BB	0.2	4+	9	7	26	17	9	16	16	16
86	2002.04	BB	3.8	4+	8	8	21	12	10	12	14	14
132	2004.02	BT	0.2	1+	8	7	38	16	Neg	Neg	12	12
133	2004.03	BL	4.8	4+	8	8	11	16	11	13	13	13
134	2003.12	BL	2.6	4+	10	7	9	13	Neg	15	15	22
135	2004.04	BL	3.0	4+	9	8	9	13	11	16	24	24
136	2004.03	BL	3.8	4+	9	7	11	14	10	16	15	15
137	2004.03	BL	2.2	3+	8	8	9	13	8	17	17	17
138	2004.02	BL	4.0	4+	8	9	15	12	8	19	17	17
139	2003.12	BT	0.2	1+	8	8	36	15	9	15	16	16
140	2004.02	BL	4.6	5+	8	8	19	13	10	12	16	16
141	2004.03	BL	4.4	5+	8	7	20	11	10	16	13	13
143	2004.04	BL	4.0	4+	9	8	19	15	12	12	17	17
144	2004.04	BT	1.0	0	8	7	25	16	8	15	Neg	15
145	2003.11	BL	3.4	5+	8	9	26	15	13	13	17	17
146	2003.12	LL	5.4	5+	8	7	24	16	9	15	13	13
147	2003.09	BL	3.8	4+	9	7	25	17	9	17	12	12
148	2004.02	BT	0.0	0	Neg	7	29	Neg	8	Neg	Neg	18
149	2004.03	BL	4.0	4+	8	8	35	15	9	15	18	18
150	2003.09	BT	0.0	2+	9	7	25	13	Neg	16	11	11
151	2003.12	BL	3.6	4+	8	9	18	13	11	13	20	20
152	2003.12	TT	0.0	0	7	7	13	14	8	19	17	17
153	2004.02	LL	5.0	4.0+	8	8	26	16	8	15	20	20
154	2002.12	BL	1.8	4+	9	7	13	14	11	14	15	15
196	2004.01	BT	0.0	0	8	7	16	12	7	14	Neg	18
197	2004.11	BL	3.2	4+	7	9	20	16	8	20	18	18
198	2004.11	BT	0.0	1+	8	7	25	16	8	15	17	17
199	2004.01	BT	0.0	0	8	7	25	16	8	16	18	18
233	2005.01	BL	2.6	4+	8	7	30	11	10	26	23	23
234	2005.01	BL	3.0	5+	8	7	28	11	10	28	23	23
235	2005.02	BL	2.6	4+	8	7	11	12	8	14	16	16
236	2005.03	BL?	3.6	4+	8	10	11	11	8	18	18	18
237	2005.04	BL	3.6	5+	9	8	9	13	12	16	21	21
238	2005.03	BT	0.0	1+	8	9	9	11	8	14	Neg	18
239	2005.04	BL	3.4	5+	9	8	9	13	11	16	24	24
240	2005.04	BT	0.0	2+	9	8	9	13	11	16	25	25
241	2005.04	LL	3.6	5+	8	8	9	13	11	17	13	13
242	2005.04	BL	1.8	4+	10	8	9	13	Neg	15	22	22
243	2005.04	BT	0.0	1+	8	7	30	11	8	14	16	16
244	2005.05	BT	0.0	2+	8	8	9	13	Neg	14	18	18
245	2005.05	LL	4.6	4+	9	8	9	13	11	16	20	20
246	2005.06	BT	0.6	2+	9	7	11	14	10	16	13	13
247	2005.06	BL	2.8	4+	9	8	44	15	9	16	12	12
248	2005.06	TT	0.0	0	9	8	13	10	Neg	22	17	17
249	2005.07	BL	2.0	4+	9	8	44	17	9	17	12	12
268	2005.07	BL	1.0	4+	9	7	11	13	10	14	17	17
269	2005.09	BL	3.6	4+	7	7	36	11	10	16	18	18
270	2005.09	TT	0.0	0	10	7	9	11	10	Neg	18	18
271	2005.09	BL	4.2	4+	8	8	9	13	11	15	18	18
272	2005.09	TT	0.2	1+	8	8	29	13	9	15	14	14
273	2005.09	BL	2.4	4+	8	8	9	13	8	15	16	16
274	2005.10	BL	0.8	5+	8	9	26	16	13	13	18	18
275	2005.10	BL	2.6	4+	8	8	22	15	9	15	18	18
276	2005.10	BL	1.6	4+	8	8	9	14	10	15	19	19
277	2005.09	BT	1.2	1+	8	8	9	13	11	14	18	18
285	2005.12	BT	0.3	1+	8	9	18	16	11	NS	22	22
286	2006.03	BT	0.0	2+	8	NS	24	18	12	13	18	18
287	2006.03	BL	2.6	4+	9	8	9	13	12	16	24	24
288	2006.03	TT	0.0	1+	8	8	Neg	Neg	Neg	15	Neg	15
289	2006.03	BL	3.8	5+	9	7	10	13	8	14	16	16
290	2006.04	BT	0.6	2+	9	6	12	14	10	15	14	14
291	2006.04	BT	0.2	1+	9	7	10	15	8	14	16	16
296	2006.05	BL	2.2	4+	8	8	9	14	11	16	Neg	16
297	2006.06	BT	1.2	2+	9	8	9	13	11	16	14	14
298	2006.06	BL	2.8	4+	9	8	9	13	11	ND	ND	ND
299	2006.06	BL	3.0	4+	9	8	9	14	11	ND	ND	ND
300	2006.07	BL	2.4	4+	8	8	25	15	10	ND	ND	ND
301	2006.07	BL	2.0	4+	8	8	15	13	9	ND	ND	ND
302	2006.08	BL	1.0	2+	9	8	9	13	10	17	22	22
312	2006.10	BL	2.0	3+	ND	8	9	14	P	ND	ND	ND

注: No 无标本; Neg 结果为阴性; ND 未做; P 为 PCR 阳性, 在测序中

讨 论

尽管从国家水平看,我国已达到基本控制麻风病的目标。但是在云、贵、川及西藏等部分地区,麻风病尚未控制。2002-2006年云南省丘北县每年新发现病例数仍在20~30例,说明麻风病仍在当地传播流行。目前对麻风病尚未控制的原因缺乏了解。分子流行病学在结核病等传染病研究已开展近10年^[9],但对麻风病的研究才刚起步。本研究以丘北县为现场,对这一特定群体、特定地理区域和在一定时期内流行的病原菌,开展菌株的基因分型、评价基因分型及追踪麻风病传播链前瞻性研究的可行性。

鉴定基因型与传播相关的聚集株,首先要有一定的群体内选择有足够异质性、能识别或区分多个传播的聚集株的基因标记物。这些标记物应足以稳定,能将当前传播中共同的菌株联系起来。高度稳定,而多样性有限的单核苷酸多态性(SNP)标记物或位点^[10],不适宜较小区域或短传播链的研究。近年来,形成机制为链滑动与错配重组的短重复序列,已成为研究病原体有用的标记物^[4]。麻风菌基因组测序成功后已筛选了44个麻风菌VNTR重复序列,确立9个多态性较高的位点^[11]。经裸鼠数次传代观察基因位点稳定性的研究显示,仅部分位点有1或2个拷贝数的变化^[8]。本研究初期以5个微卫星和5个小卫星位点,对50份我国麻风菌株的VNTR分型揭示,2个微卫星AC8b, GGT5和5个小卫星(12-5, 18-8, 21-3, 23-3和27-5)同一性高达97%~100%,仅AC9, GTA9和6-7位点具有多态性。这证实我国麻风菌株基因多态性有限^[6]。为此,在3个多态性位点的基础上,本研究进一步选择了另4个微卫星位点进行菌株分型。

表3 高发家庭内菌株的基因型

家庭号	标本号	临床型	家庭关系	收集日期	AC9	6-7	GTA9	AT17	AC8a	AT15	AT18
1(GZ)	237	BL	父亲	2005.04	9	8	9	13	12	16	21
	135	BL	儿子	2004.05	9	8	9	13	11	16	24
	81	BL	儿子	2002.03	9	7	9	No	No	No	No
	287*	BL	儿子	2006.03	9	8	9	13	12	16	24
12*(GZ)	296*	BT	兄	2006.05	8	8	9	14?	11	16	Neg
	297*	BL	弟	2006.06	9	8	9	13	11	16	14
13*(GZ)	239	BL	岳父	2005.04	9	8	9	13	11	16	24
	302*	BL	女婿	2006.08	9	8	9	13	10	18	22
14(GZ)	268	BL	兄	2005.07	9	7	11	13	10	14	17
	290*	BT	弟	2006.04	9	6	12	14	10	15	14
3(SD)	246	BT	兄	2005.06	9	7	11	14	10	16	13
	136	BL	弟	2004.05	9	7	11	14	10	16	15
4(SD)	154	BL	兄	2004.05	9	7	13	14	11	14	15
	73	BL	弟	2003.02	9	7	12	No	No	No	No
2(GZ)	150	BT	丈夫	2004.05	9	7	25	13	ND	16	11
	147	BL	妻子	2004.05	9	7	25	17	9	17	12
5(SD)	249	BL	父亲	2005.07	9	8	44	17	9	17	12
	247	BL	儿子	2005.06	9	8	44	15	9	16	12
6(GH)	275	BL	兄	2005.09	8	8	22	15	9	15	18
	277	BT	弟	2005.01	8	8	9	13	11	14	18
7(BDS)	238	BT	兄	2005.03	8	9	9	11	8	14	Neg
	133	BL	弟	2004.05	8	8	11	16	11	13/15	13
8(JP)	148	BT	姊	2004.05	Neg	7	29	Neg	8	Neg	Neg
	198	BT	妹	2005.01	8	7	25	16	8	15	17
9(XD)	274	BL	叔	2005.09	8	9	26	15	13	13	18
	145	BL	侄	2004.05	8	9	26	15	13	13	17
10(WL)	233	BL	女儿	2005.01	8	7	30	11	10	22	24
	234	BL	母亲	2005.01	8	7	28	11	10	17	24
11(SP)	196	BT	兄	2005.01	8	7	16	12	7/ND	14	Neg
	270	TT	弟	2005.09	10	7	9	11	10	Neg	18

注:No 无标本; Neg 结果为阴性

尽管 VNTR 被认为是可应用的菌株分型系统,但细菌在繁殖过程中,等位基因型或重复序列数目的增加或减少并不清楚。不同位点之间的突变模式也可能不完全相同。重复序列的逐步增减变化模式可能是构成有遗传学关系的菌株之间的基础。对本研究揭示丘北县麻风菌株进化似乎受 GTA9 位点的等位基因型变化的影响,而形成了以 GTA9 位点不同重复序列数的 A、B、C、D、E 5 组菌株。Young 等^[12]应用 3 个微卫星对印度的一个村庄 33 株麻风菌分型发现,只有 2 个菌株基因型相同。这可能因分型标记物多态性高,致使鉴别力过高,导致与传播相关的菌株之间失去联系。Zhang 等对不同时期从日本、泰国、韩国和印度尼西亚收集的麻风菌采用很多 VNTR 位点分型。但由于菌株收集年代不同,以及菌株是经动物传代后保留,分型后并未揭示有基因型相同的菌株,也未发现菌株之间有任何流行病学联系^[11]。设想如果本研究将等位基因型多的 GTA9、GAA21、AT18 位点作为首选标记物,就很难在丘北县识别出流行病学相关联的菌株。以丘北县为现场的研究揭示,含 AT 或 TA 的微卫星位点,存

在的微进化很明显,甚至在同一家庭内传播的菌株也是这样。因此菌株分型除要考虑位点的数目,还应注意流行菌株位点等位基因的多态性。本研究与文献^[11,13]结果一致,从多数的高发家庭收集的菌株均具有相同的基因型,提示在家庭中的菌株来自同一传染源。

本次调查表明:①麻风病家庭内的传播具有重要的流行病学意义。家庭内数名患者分离菌株的基因型高度一致,表明麻风菌传播早在患者被诊断和 MDT 治疗之前。②家庭内患者分离的菌株在一些位点存在一个或者两个等位基因型的差别,可能由于一些位点,特别是富含 AT 区的位点存在较高的突变,这可能和麻风病的较长的潜伏期有关。麻风病在高发家系内的高度流行已被 2006 年在 GZ 乡新发患者所证实。2006 年 GZ 乡新发现患者 7 例,其中 6 例的 VNTR 基因型均与该乡流行的 A 菌株基因型一致,1 例因靠近邻近乡而与邻近乡的 B 株的基因型一致。2 例新发患者组成了家庭(F12),因 2006 年又有新发病例组成了家庭 F13 和 F14;另一名患者来源于已经存在的高发家庭(F1),导致高发

家庭由 2006 年前的 11 家增加至 14 家。菌株基因分型与流行病学调查发现,这一区域内的聚集株或优势株往往就是高发家庭内发现的菌株。因此推论,村庄内的高发家庭构成了疫源和传染源,使基因型一致或相似的菌株向同村邻居、同乡异村和邻乡传播,形成聚集菌株。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. 2006. WER, [Online] <http://www.who.int/wer/en/>.
- [2] Cole ST, Eglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 2001, 409 (6823): 1007-1011.
- [3] Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of *Mycobacterium leprae* strains. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:1666-1672.
- [4] Belkum AV, Scherer S, Alphen LV, et al. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, 62 (2):275-293.
- [5] 翁小满,温艳,袁联潮,等. 酚糖酯-免疫球蛋白 M 和鼻分泌物中麻风菌 PCR 检测在麻风流行病学中的应用. *中国麻风皮肤病杂志*, 2005, 21:425-429.

- [6] 翁小满,温艳,田秀均,等. 50 株麻风菌基因分型的初步研究. *中华流行病学杂志*, 2006, 27:402-405.
- [7] Ridley RS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity—a five group system. *Int J Lepr*, 1966, 34:225-273.
- [8] Truman R, Fontes AB, De Miranda AB, et al. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(6):2558-2565.
- [9] Sujatha N. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res*, 2004, 120:233-247.
- [10] Monot M, Honore N, Garnier T, et al. On the origin of leprosy. *Science*, 2005, 308:1040-1044.
- [11] Zhang L, Budiawan T, Matsuoka M. Diversity of potential short tandem repeats in *Mycobacterium leprae* and application for molecular typing. 2005, 43(10):5221-5229.
- [12] Young SK, Taylor GM, Jain S, et al. Microsatellite mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected humans. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:4931-4936.
- [13] Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, et al. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:741-745.

(收稿日期:2006-12-06)

(本文编辑:张林东)

· 天元科技园地 ·

一起小学校内乙型流感暴发的调查

祝丽萍 王新明

2004 年 9 月下旬,浙江省江山市某乡镇中心小学发生了一起由乙型流感病毒引起流行性感冒暴发。经调查本次乙型流感共发现患者 65 例,罹患率 15.26%。

1. 流行病学特征:首发病例于 9 月 21 日突起高热、感觉不适。发病高峰期在 9 月 28-29 日,分别有 22 例(33.85%)和 24 例(36.92%)。该校所有班级均有发病,其中五年级(2)班 28 例,发病率为 60.87%,明显高于其他班级($\chi^2 = 54.593, P < 0.005$)。男生发病 33 例(53.85%),发病率 14.04%;女生发病 32 例(46.15%),发病率 16.75%;男女生发病的差异无统计学意义($\chi^2 = 0.599, P > 0.05$)。住宿生发病率 16.67% (8/48),其他学生 15.08% (57/378),差异无统计学意义($\chi^2 = 0.083, P > 0.05$)。临床症状主要为起病急,大部分病例体温 38~39℃,多数伴头痛、头晕、咽痛或咽部不适等。

2. 实验室检查:病例检测血常规白细胞计数大多正常,部分病例中性粒细胞稍高。江山市疾病预防控制中心先后采集 4 份病例标本,其中 3 份应用胶体金法检出乙型流感病毒抗体。浙江省疾病预防控制中心从 6 份标本的 4 份中检出乙型流感病毒抗原。

3. 控制措施:疫情发生后,江山市疾病预防控制中心及

时采取病例隔离治疗,每天对教室、寝室、餐厅的空气、地面、课桌椅等进行规范消毒,公共场所充分通风,宣传卫生防病知识等控制措施,疫情迅速得到控制,10 月 3 日后无新病例发生。

4. 分析讨论:我国流感每年发病率为 10%~30%^[1],其流行病学特点是暴发、迅速蔓延、播及面广^[2],南方地区多发生在冬夏两季,发病率高,人群普遍易感,通过患者及病原携带者的飞沫传播。本次疫情为乙型流感病毒引起,其中五年级(2)班发病率为 60.87%,明显高于其他班级,经现场勘察,该班教室处于教学楼一楼西端,南、北两面均有 2 m 高围墙,教室通风条件较差,是发病较多的主要因素。

本次疫情暴露出一些问题,如学生家长对流感与普通感冒的认识混淆,对发生的病情不够重视;学校对早期疫情苗头没有充分的警觉。因此笔者认为还需进一步加强《传染病防治法》、《突发公共卫生事件应急条例》等疾病预防控制相关法律法规的宣传,加强预防接种工作及健康教育力度。

参 考 文 献

- [1] 郭元吉,唐耀武. 加强监测,迎接流行性感冒新挑战. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(1):2.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会. 流行性感冠临床诊断和治疗指南(草案). *中华结核和呼吸杂志*, 2002, 25(2):66.

(收稿日期:2006-12-28)

(本文编辑:张林东)