

# 50 株麻风菌基因分型的初步研究

翁小满 温艳 田秀君 王红斌 谈效俊 李桓英

**【摘要】** 目的 了解中国麻风菌基因分型图谱,以选择合适麻风病流行病学的基因位点。方法 从云南省文山州的 37 例、其他省市的 13 例麻风患者的皮损活检中,提取麻风菌 DNA。以麻风菌基因组内的可变数目的串联重复序列(VNTR)为基因分型的基础,对 11 个位点进行聚合酶链反应,确定其重复序列的拷贝数。结果 中国麻风菌株在 GGT5、12-5、21-3、23-3 位点的同一性高达 100%;12-5 位点仅表现为 3 个拷贝;AC8、18-8、27-5、*rpoT* 的同一性分别达 97%、94%、97%、85%;GTA9、6-7、AC9 位点有非常明显的多样性,但 GTA9 的多样性与其他国家不同。结论 中国麻风菌株多数位点的基因型与印度、菲律宾的菌株一致,提示中国麻风菌株与印度和菲律宾的菌株相近;12-5 位点可作为区别中国与周边国家麻风菌株基因分型的标记物;VNTR 基因分型方法可应用于麻风病传播链和分布的流行病学研究。

**【关键词】** 麻风菌;基因分型

**Preliminary study on the genotyping of *Mycobacterium leprae* on 50 isolates from China** WENG Xiao-man\*, WEN Yan, TIAN Xiu-jun, WANG Hong-bin, TAN Xiao-jun, LI Huan-ying. \*Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China

**【Abstract】** **Objective** To understand the genotypic mapping of *Mycobacterium leprae* identified in China and to compare with those from other countries to select suitable alleles for epidemiological investigation in the transmission chain of leprosy. **Methods** Various number of tandem repeat(VNTR) in genomic DNA of *Mycobacterium leprae* was used in the present genotyping study. 33 skin biopsies from Wenshan prefecture, Yunnan province and 17 from other parts of China were studied. DNA extracted from skin biopsies of leprosy patients was subjected to PCR followed by agarose gel analysis and DNA sequencing to determine the number of repeats. **Results** Loci GGT-5, 12-5, 21-3 and 23-3 were as highly homogenous as 100%; The homogeneity of loci AC-8, 18-8, 27-5 and *rpoT* were 97%, 94%, 97% and 85% respectively. Loci GTA-9, AC-9 and 6-7 showed significant allelic diversity in isolates and the diversity of GTA-9 in *Mycobacterium leprae* isolated from China was also different from those identified other countries. We had subjected loci GTA-9 and the ten loci to phylogenetic tree analysis respectively. **Conclusion** The present study revealed that the genotype of *Mycobacterium leprae* identified from China was close to the strains from the Philippines and India although a few loci were somehow differentiate. Locus 12-5 manifested as only 3 copies in China whereas 4-5 copies predominating in other countries. 12-5 locus might serve as a useful marker to differentiate Chinese strains from those in other countries. However, further study on the diversity of GTA-9 was needed in China. The molecular typing of *Mycobacterium leprae* from different geographic areas might be useful in studying the transmission of leprosy.

**【Key words】** *Mycobacterium leprae*; Genotyping

麻风菌基因组 DNA 测序的成功和基因组学的研究,为麻风菌基因分型和流行病学的研究开辟了广阔的前景<sup>[1]</sup>。以麻风菌基因组内数目可变的串联重复序列(VNTR)为基础的基因分型是研究麻风菌

的传播链、追踪传染源的有用方法<sup>[2]</sup>。本研究对我国的麻风菌株 11 个 VNTR 位点进行分型,以初步了解中国麻风菌株的基因型特征,为选择适合的基因位点进行流行病学研究服务。

## 材料与方 法

1. 研究对象与标本:采集云南省文山州 37 例麻风病患者和北京热带医学研究所诊治的 13 例其他省市麻风病患者的皮损活检标本,放置于 70% 乙醇

基金项目:美国科罗拉多大学牵头的七国合作课题资助项目(NIH/NIAID RO1 AI-063457-01)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院 北京热带医学研究所(翁小满、温艳、田秀君、王红斌、李桓英);北京大学理论生物中心 北京大学物理学院(谈效俊)

固定备用。

2. 麻风菌 DNA 提取与 VNTR-PCR: 采用 QIAamp DNA 试剂盒(QIAGEN, Hilden Germany), 从 70% 乙醇固定的组织中提取 DNA。根据 Kimura 等研究方法设计 11 个 VNTRs 位点的 PCR 引物, 其中有 6 个 VNTR 位点的碱基数 >6 (表 1)。PCR 反应条件: 94℃ 7 min, 94℃ 1 min, 60℃ 2 min, 72℃ 4 min, 40 个循环; 72℃ 7 min。

表1 重复序列碱基数大于 6 的 6 个 VNTRs 位点重复序列

位点	重复序列
6-7	(GCACCT) 7
12-5	(GAGTTGTTGAG) 5
18-8	(GGC <sub>c</sub> CGCTGGCCAGTAC) 8
21-3	(CAAGCCAGGAATCAAGTTGAT) 3
23-3	(ATAATACTGTAGTGAACGACATC) 3
27-5	(CCGGTGGTg <sub>c</sub> CGCTGGTGGGTTTC <sub>c</sub> ) 5

3. 结果判定: 5 个以上碱基重复序列的小卫星片段, 采用 2.5% 琼脂糖电泳, 与已知重复序列数的 DNA 标准条带对照比较, 初步判断结果。有差异的标本, 进行测序; 5 个以下碱基重复序列的微卫星片段 PCR 产物直接测序; 对重复序列数多 (>20 拷贝数) 的片段, 采用正向或/和反向测序, 以确定准确的重复拷贝数。测序由上海博亚生物技术公司完成。

4. 系统发育树分析: 采用逐级变异模型分析对 GTA9 位点分析; 采用 Jaccard 距离和最小进化法构建 10 个 VNTR 位点数据的分类树。

结 果

1. 11 个基因位点分型结果: 中国菌株 GGT5、12-5、21-3 和 23-3 这 4 个位点, 分别发现仅有一个基因型, 重复序列的拷贝数分别为 4、3、2 和 2 个拷贝, 同一性达 100%。AC8 和 27-5 这 2 个位点, 虽具有两个基因型, 但主要基因型分别为 8 和 5 拷贝, 同一性达 97%, 即其中分别仅有 1 株菌株在这 2 个位点上, 分别为 7 和 6 个拷贝。94% 的菌株在 18-8 位点

上, 表现为 7 个拷贝, 仅有 2 个菌株为 6 和 8 个拷贝。85% 菌株的 *rpoT* 基因的重复序列为 3 个拷贝 (表 2)。

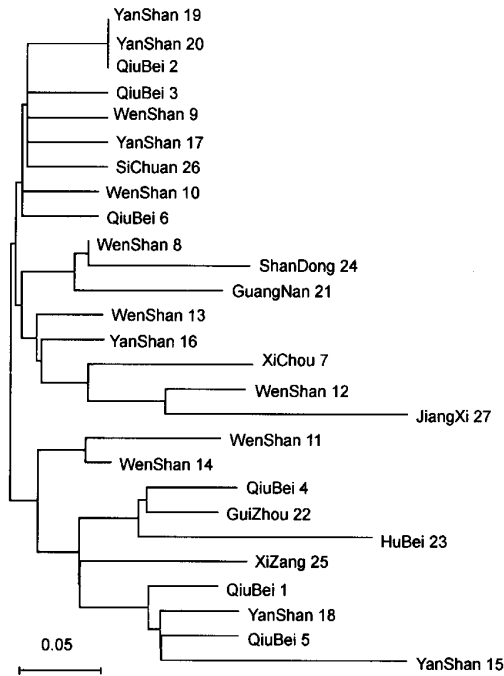
2. 32 株麻风菌的基因进化分析: 麻风菌 10 个 VNTR 位点构建的分类树见图 1, 来自云南省文山州的菌株, 多数为一大支, 相似性很高; 其他地区的菌株与文山州的部分标本有相似性。虽然中国的麻风菌株的 VNTR 多数位点一致性很高, 但是 GTA9 位点的多样性却非常明显, 因此, 以 GTA9 的拷贝数 22 为界限, 进行了逐级变异模型分析, 32 株麻风菌可分为 2 型。图上部的菌株, GTA9 的拷贝数在 22 以下, 基因型的等同性较高。图下部的菌株, GTA9 的拷贝数在 22 以上, 少数菌株的基因型的差异很大。*rpoT* 基因(箭头) 4 个拷贝的菌株, 多分布在 GTA9 重复序列 22~45 拷贝组(图 2)。

讨 论

麻风菌基因组含有丰富的简单重复序列, 约占基因组的 2%, 以串联重复序列为多。重复序列的变化可能与麻风菌分裂过程中, DNA 链打滑致使重复序列的拷贝数变化<sup>[3]</sup>; 或 DNA 复制时, 在重复序列部位发生暂停, 致使合成的链脱离, 恢复后又以脱离链为模板继续复制, 因 DNA 修复, 使重复序列部位的重复数增加, 这可能是随机的, 也可能与进化有关<sup>[4]</sup>。这些串联重复序列分布在基因内区域和非基因内区域, 目前不清楚它们与基因功能的关系。VNTR 已广泛应用于多种微生物分子分型, 方法简便, 重复性好。本文应用 VNTR 麻风菌分型研究揭示, 在我国的 50 份标本中, 多数基因位点很稳定, 即重复序列数, 或拷贝数无变化或变化很小。但少数基因位点, 如 CA9、6-7, 尤其是 GTA9, 具有明显的多态性。然而, 麻风菌接种裸鼠和狨猴的传代研究却显示 GTA9 位点的稳定性较好<sup>[4]</sup>, 因此有必要对我国不同年代、不同地区的菌株, 深入研究 GTA9

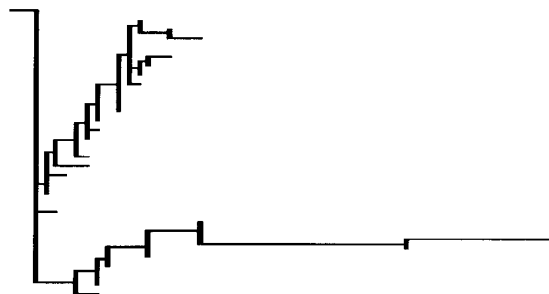
表2 中国 50 株麻风菌 11 个位点的主要等位基因型、频率及等位基因数

项 目	等 位 基 因 位 点										
	AC8	AC9	GGT5	GTA9	6-7	12-5	18-8	21-3	23-3	27-5	<i>rpoT</i>
菌株来源											
云南省文山州 (n=37)	24	22	27	25	37	37	37	37	26	29	37
其他省市 (n=13)	7	8	9	8	13	13	13	13	8	8	13
主要等位基因型和频率 (%)	8(97)	8(67)	4(100)	12(18)	7(82)	3(100)	7(94)	2(100)	2(100)	5(97)	3(85)
等位基因型	7,8	5,7,8,9,10	4	9-62	6,7,8,9,10	3	6,7,8	2	2	5,6	3,4
等位基因数	2	5	1	>20	5	1	3	1	1	2	2



注: WenShan、YanShan、QiuBei、GuangNan 属云南省文山州, 余为我国其他省市

图1 32株麻风菌的基因进化分析



← 表示 *rpoT* 位点为 4 个拷贝的菌株

图2 中国 32 株麻风菌株 GTA9 位点的系统发育树分析

位点的变化规律。对 GTA9 位点的系统发育树分析显示,我国的麻风菌株可分为两个基因型。有研究认为,不宜选择变异频率大的位点作系统发育树分析,因此我们采用 ME 方法进行系统发育树分析。

以前的研究显示,印度和菲律宾来源的麻风菌株与标准株(TN)的基因型匹配一致,而其余的可分 2 支,印度、菲律宾、泰国、圭亚那为一支;北美、巴西和埃塞俄比亚为另一支。以 VNTR 为基础的基因分型法对包括我国在内不同国家来源的麻风菌进行系统发育树分析提示,菲律宾、中国的麻风菌株多数位点与亚洲菌株基因型一致,哥伦比亚与美洲一致。中国麻风菌株与印度、菲律宾菌株比较,除 12-5 和

GTA9 的主要等位基因型有明显差异外,其他位点仅在于等位基因数的表现差异。以 *rpoT* 基因重复序列(GAC ATC)为例,日本、韩国的麻风菌株以 4 个拷贝为主,印度、泰国以 3 个拷贝为主,而我国 85% 的菌株 *rpoT* 基因为 3 个拷贝<sup>[5,6]</sup>,进一步支持我国的麻风菌基因型与东南亚麻风菌株相似的论点。以上研究证实不同地区麻风菌的基因型确实存在着差异,为麻风菌地理分布、历史变迁和传播链的研究提供了依据。

我国版图辽阔,人口流动性大,需要进一步对我国各地区的菌株进行分型,以寻找能鉴别我国与其他国家及我国不同地区之间的麻风菌基因型差异的、可追踪传播链的位点。本研究发现,文山地区的 AC9 位点为 8 和 9 拷贝,其他省市拷贝数为 5, 7 和 8,即未在其他省市中发现有 AC9 为 9 个拷贝的菌株(本文未发表数据)。此外,中国麻风菌株 12-5 位点的重复序列均为 3 个拷贝,而来自印度、菲律宾、泰国、美国、哥伦比亚(南美)、埃塞俄比亚、马拉维(非洲)的 44 个菌株,除 1 株菌株为 3 个拷贝外,其他均为 4 或 5 个拷贝。中国 GTA9 具有明显的多态性,与其他国家截然不同。12-5 和 GTA9 能否成为我国与其他国家菌株相区别的标记物,也需进一步证实。

结核菌基因分型可应用于鉴别复发和再感染<sup>[7]</sup>。本研究将 GTA9、AC9 等位点作为标记物,对同一患者的初诊和疗后复发的配对标本,进行耐药检测和分型。不仅可观察 GTA9 位点的稳定性和多态性,而且可为鉴定复发和再感染以及体内持久菌再度繁殖时是否发生变异提供依据。基因分型的最终目的是研究病原体的传播,选择合适的位点作为菌株分型的标记物,是基因分型应用于流行病学研究的关键。在我国具有多样性的 GTA9、AC9 和 6-7 位点,是否可作为流行病学研究中菌株分型的标记物,有待进一步评价。国外一些麻风病流行国家,已将基因分型作为流行病学研究工具,在高流行乡村(疫村)对麻风病患者体内的、接触者携带的、以及存在于土壤、水等环境中的麻风菌进行基因分型,追踪麻风菌传播的研究<sup>[8-10]</sup>。我国云南、贵州、四川三省麻风病流行区的发病率仍处于较高水平,云南省南部与越南、老挝,西部与缅甸、泰国等相邻,有必要将我国云南省的麻风菌基因型与邻国、特别是少菌型在新病例中占大多数的印度比较外,还有必要对流行疫村的患者、家内接触者和环境中存在的麻风

菌进行分型,追踪当地麻风菌的传播,制定干预措施,以利于阻止麻风菌在高风险人群中的传播。

参 考 文 献

- 1 Cole ST, Supply P, Honore N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Int J Lepr*, 2001, 72: 449-461.
- 2 Groathouse NA, Rivoire B, Kim H, et al. Multiple polymorphic loci for molecular typing of strains of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 1666-1672.
- 3 Douglas Y. Prospects for molecular epidemiology of leprosy. *Lepr Rev*, 2003, 74: 11-17.
- 4 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: 2558-2565.
- 5 Masanori M, Shinji M, Masanori K, et al. *Mycobacterium leprae* typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. *Int*

- J Lepr*, 2000, 68: 121-127.
- 6 Chae GT, Lee SB, Kang TJ, et al. Typing of clinical isolates of *Mycobacterium leprae* and their distribution in Korea. *Lepr Rev*, 2002, 73: 41-46.
- 7 Barnes P, Cave M D. *Molecular Epidemiology of Tuberculosis*. *N Engl J Med*, 2003, 349: 1149-1156.
- 8 Masanori M, Zhang LF, 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.
- 9 Shin YC, Lee HJ, Lee HY, et al. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 4535-4538.
- 10 Young SK, Taylor GM, Jain S, et al. Microsatellite Mapping of *Mycobacterium leprae* populations in infected human. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 4931-4936.

(收稿日期: 2005-06-23)

(本文编辑: 孙强正)

· 疾病控制 ·

北京市某小学一起疑似胃肠型感冒偶合疫苗接种反应的调查

刘方 孙灵利 陈天京

北京市朝阳区某小学一年级全体学生 2005 年 11 月接种麻疹或麻风腮三联疫苗后,出现腹痛、呕吐、腹泻等症状,怀疑是疫苗接种后的异常反应,为此朝阳区疾病预防控制中心进行了现场调查处理。一年级共有 39 名学生,其中男生 16 名,女生 23 名。按照北京市免疫程序接种麻疹或麻风腮三联疫苗。接种疫苗共 21 人,其中接种 A 厂家麻风腮疫苗 12 人,接种 B 厂家麻风腮疫苗 3 人,接种 B 厂家麻疹疫苗 6 人。采用现场流行病学的调查方法,分析接种疫苗与出现症状之间的关系;统计分析使用 SPSS 11.0 软件。

结果与分析:该学校 11 月 16 日接种麻疹或麻风腮三联疫苗后,当天即有 3 例出现腹痛、呕吐等症状,第 2 天有 6 例出现类似症状,18 日又有 5 例发病。总计发病 14 例,男女生各 7 例。病例主要表现为腹痛、恶心呕吐、腹泻等消化道症状,个别有发热、头晕头痛症状。全部发病者中,腹痛 11 例(占 78.57%);呕吐 7 例(占 46.67%);另外有头痛者 3 例,腹泻 2 例,恶心 2 例,头晕 1 例,发热 1 例。通过初步调查认为此起疫情与接种疫苗关系不大,这是因为:分别观察不同厂家的 3 种疫苗与出现腹痛呕吐等症状的关系,将是否接种疫

苗作为暴露,出现腹痛呕吐等症状者作为病例,发现接种两个厂家的 3 种疫苗与出现腹痛呕吐等症状均无统计学关联( $P > 0.05$ ,且 OR 值的 95% CI 的下限  $< 1$ );其次,发生此起疫情的班级中没有接种疫苗的学生也出现类似症状;而同期本区其他学校接种该疫苗均未发生类似现象。此次疫情表现为接种后短期内出现大量病例,临床主要表现为腹痛、呕吐、腹泻等消化道症状,但发病学生没有共同饮食史,均在家中就餐,所以推测引发此起疫情的原因可能有二:一是疫苗接种后的群发性臆症反应,二是传染性疾病偶合疫苗反应。因此,采取了派专人监控学生发病进展,发现新发病例立即回家休息;对症治疗等措施;疫情迅速得到控制,发病学生经过治疗症状明显好转。分析调查结果,此次疫情发生在 11 月,为冬季呼吸道传染病高发期;发病主要集中在 16-18 日 3 天,此后再无新发病例,考虑可能与 19-20 日 2 天为周末学生放假,减少了相互传播的机会,使疫情迅速得到控制;另外,1 名调查人员在调查后的第 2 天也出现腹胀呕吐等症状,表明此起疫情具备一定的传染性;临床表现又主要以腹痛、呕吐、腹泻等消化道症状为主,因此可认定此次疫情为一起偶合于疫苗接种后发生的疑似胃肠型感冒暴发。

作者单位:100021 北京市朝阳区疾病预防控制中心传染病地方病控制所

(收稿日期: 2005-12-15)

(本文编辑: 尹廉)