

广东省麻风菌株基因分型研究

黎明 王晓华 苏婷 邢燕 翁小满

【摘要】 目的 了解广东省麻风菌株基因型及其传播与国内外的关系,探讨外来麻风病患者对广东省流行可能产生的影响。方法 对广东省籍与外省籍麻风患者取皮肤活检,进行麻风菌株的可变数目串联重复序列(VNTR)与单核苷酸多态性(SNP)分型。结果 广东籍患者主要以 SNP 1 型菌株为主,少数为 SNP 3 型菌株。输入性病例菌株均为 SNP 3 型菌株。SNP 1 型菌株的 VNTR 基因型,尤其是 18-8、12-5、ML-1、(TA)10 与(GGT)5 位点的等位基因与国内其他地区 SNP 3 型麻风菌株不同。但是 SNP 3 型的广东籍患者其菌株的 VNTR 基因型与 SNP 1 型菌株的 VNTR 型很接近,18-8、12-5 等位基因型一致,差异仅在 ML-1、(TA)10 和(GGT)5 位点。结论 广东籍患者麻风菌株以 SNP 1 为主,与国内多地区的菌株不同。推测其传播路径与早期“海上丝绸之路”有关。少数为 SNP 3 型的广东籍患者是否为输入病例的二代传播,值得深入研究及监测追踪。

【关键词】 麻风菌;基因分型;传播

Genotyping of *Mycobacterium leprae* in Guangdong province Li Ming¹, Wang Xiao-hua¹, Su Ting¹, Xing Yan², Weng Xiao-man². 1 Department of Leprosy Prevention, Guangdong Provincial Center for Skin Disease & STI Control, Guangzhou 510095, China; 2 Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing Tropical Medicine Research Institute

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

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 3067111) and the National Institutes of Health (NIH)/National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) of America (No. RO1-A1-63457).

【Abstract】 Objective To understand the genotypes of *Mycobacterium leprae* collected from Guangdong province, China and to analyze the routes of leprosy transmission both inside and outside of Guangdong. The impact of emigrant leprosy patients to the endemic nature of the disease in Guangdong was also studied. **Methods** Typing on strains with variable number of tandem repeats (VNTR) and single nucleotide polymorphism (SNP) were performed on the local cases and emigrant cases based on skin biopsy. **Results** Most isolates from local patients belong to SNP type 1 and SNP type 3 isolates were found just in a small part of local isolates. However, all the emigrants were carrying SNP type 3. Within the SNP type 1 strain from Guangdong, alleles at the 18-8, 12-5, ML-1, (TA)10 and (GGT)5 differed from SNP 3 strains collected from other areas in China. However, all the SNP type 1 and SNP type 3 local isolates identified from Guangdong were having close VNTR profiles and the main differences appeared in the alleles at ML-1, (TA)10 and (GGT)5. **Conclusion** The transmission of strain with SNP type 1 seemed to be associated to the “Silk Road on the Sea”, calling for monitoring and confirming the transmission of patients with SNP type 3 in Guangdong were from the secondary transmission, by the emigrant patients. Further study on the historic spread and phylogenetic relationships between SNP type 1 and novel SNP type 3 in Guangdong is needed.

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

麻风菌的全基因组测序揭示了其菌株之间主要差异在于单核苷酸多态性(SNP)与数目可变的串联重复序列(VNTR)。尽管麻风菌的 SNP 多态性有

限,但对鉴定麻风病在全球的传播路径提供了有价值的信息,目前已有不少麻风病流行国家开展了麻风菌株 VNTR 和 SNP 的分型,试图追踪其传播。广东省历史上曾是我国麻风病的高流行区,累计发现病例约 9.6 万例,居全国首位(约占 20%)。经过近 50 年的积极防治,自 20 世纪 90 年代始已进入低流行状态。但近 10 年广东省每年新发病例仍保持在约 120 例,其中非广东籍病例(输入性病例)的比例逐年增加^[1]。本研究旨在通过检测麻风菌株基因型,了解

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.003

基金项目:国家自然科学基金(3067111);美国 NIH/NIAID (RO1-A1-63457)

作者单位:510095 广州,广东省皮肤性病防治中心(黎明、王晓华、苏婷);首都医科大学附属北京友谊医院北京热带医学研究所(邢燕、翁小满)

通信作者:翁小满, Email: wengxiaoman@sina.com

广东籍病例和输入性病例的菌株基因型及其与我国其他地区菌株间的差异,探讨麻风病的传播及输入菌株对广东省麻风病流行的影响。

对象与方法

1. 研究对象:2009—2011 年在广东省收集的 38 名麻风病病例。经多个 VNTR 位点分型后,仅 24 例具有完整分型数据(另 14 例未完成 18 个 VNTR 位点的分型,故删除),其中 6 例为非广东籍居民。24 例中结核样型(TT)2 例、界线类偏结核样型(BT)2 例、中间界线类(BB)2 例、界线类偏瘤型(BL)7 例、瘤型(LL)11 例。

2. 研究方法:

(1)VNTR 分型:采用 4 个组合的多重 PCR 及其片段长度分析(MP-FLA),确定各菌株的 18 个 VNTR 位点的重复序列数或等位基因型。其中(AC)8b、(GTA)9、(GGT)5、(AT)17、(AC)9、(AT)15、(AC)8a、(TA)18、(TTC)21、(TA)10 为微卫星位点(重复序列 < 6 bp),*rpoT*、6-7、21-3、27-5、18-8、23-3、12-5 与 ML-1 为小卫星位点(重复序列 > 6 bp)。采用引物序列和扩增子大小同文献[2]所述。用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。使用 Applied Biosystems 软件 Sequence Scanner 和 GeneMapper 人工分析色谱图。判读重复序列的拷贝数,即等位基因型。

(2)SNP 分型:采用 PCR 后的限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析 SNP 型。先扩增 SNP 位点 3,若 PCR 产物被 *BstU I* 酶切开,则该样品为 SNP 3 型或 4 型;再扩增 SNP 位点 1,若 PCR 产物被 *Sml I* 酶切开,则该样品为 SNP 4 型,否则为 SNP 3 型。若 PCR 产物未被 *BstU I* 酶切开,则该样品为 SNP 1 型或 2 型;再扩增 SNP 位点 2,若 PCR 产物被 *CviKI-1* 酶切开,则该样品为 SNP 2 型,否则该样品为 SNP 1 型^[3](图 1)。

(3)SNP 亚型分型:对于 SNP 3 型的样品,分别扩增 SNP 位点 2312059 和 413902;对于 SNP 1 型的样品,分别扩增 SNP 位点 61425、313361 和 8453。引物参考文献[4]。使用 QIAGEN 公司 Multiplex PCR Kit,采用 20 μl 反应体系,Master Mix 10 μl, Q-solution 4 μl,正、反向引物各 1 μl 终浓度为 500 nmol/L,模板 1 μl, H₂O 3 μl。

设立无 DNA 的阴性对照。扩增条件为 95 °C 预变性 15 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 90 s。经 40 个循环后,72 °C 延伸 10 min。2.5% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像仪下观察结果。PCR 阳性产物送上海生工生物工程技术有限公司北京测序部测序。

结 果

1. 菌株 SNP 分型的地理分布:24 例麻风病患者多数分布于沿海地区,由外省迁入的非广东籍病例多分布在广州市附近。18 例广东籍患者中有 13 例为 SNP 1 型菌株、5 例为 SNP 3k 型菌株。6 例非广东籍迁入患者中,除 1 例(#633)SNP 分型不成功外,5 例均为 SNP 3 型(图 2)。

2. SNP 1 型和 SNP 3 型菌株的 VNTR 基因型特征:本研究中该两型菌株的 21-3、23-3 和 *rpoT* 三个小卫星位点的等位基因型与我国多数地区菌株一致,分别为 3、2、3 拷贝,因此仅列出 5 个 VNTR 小卫星位点(6-7、27-5、18-8、12-5、ML-1)的等位基因型。表 1 为 16 例广东籍患者和 1 例江西籍患者的 VNTR 各位点等位基因型及 SNP 型。其中 13 例广东籍患者感染 SNP 1 型菌株,除 1 例(#510)菌株属 SNP 1A 外,余均为 SNP 1D。感染 SNP 3 型菌株的 3 例广东籍和 1 例原江西籍后迁入广东的患者为 SNP 3k。

表 1 还显示 13 例 SNP 1 型菌株患者和 3 例 SNP 3 型菌株患者的 VNTR 基因型,尤其是 18-8、12-5 位点的拷贝数,即等位基因型分别为 8 和 4 或 5,与我国其他地区菌株不同。但 SNP 1 型和 SNP 3 型菌株在(GGT)5、(TA)10、ML-1 位点等位基因有明显差异。SNP 1 型菌株的(GGT)5 位点有 4、5 个拷贝两种基因型,ML-1 位点多为 2 个拷贝,(TA)10 均为 7 个拷贝[SNP 1A 菌株的(TA)10 位点拷贝数为 10]。

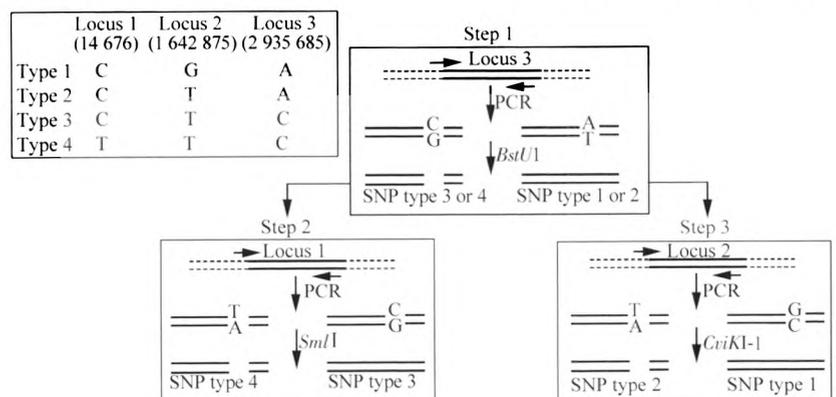


图 1 麻风菌 SNP 分型的 RFLP 实验流程

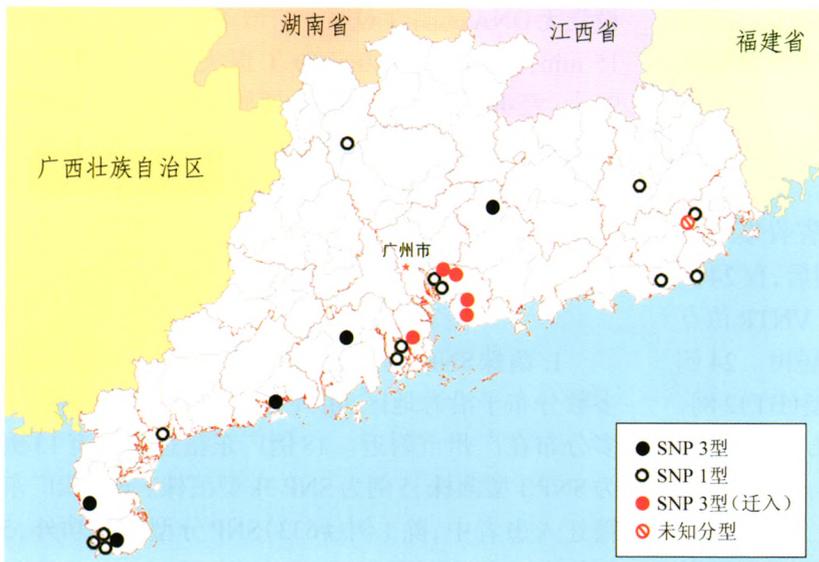


图 2 24 例麻疹病患者分离菌株 SNP 分型的地理分布

SNP 3 型菌株(GGT)5 则为 4 个拷贝, ML-1 位点均为 1 个拷贝, (TA)10 位点拷贝数均 >7。由此可见, 18-8、12-5、ML-1 与 (TA)10 位点的等位基因型明显与广东省本地的 SNP 1 型和 SNP 3 型菌株关联。

者菌株 VNTR 基因型接近广东 SNP 3 型菌株, 但由于两省接壤, 难以确认其感染菌株来源。#633 迁入广东长达 15 年, 2011 年发病期间常往返于江西和广东两地, 其母亲也于迁入广东 11 年后(2007 年)发

表 2 中 2 例广东籍患者(#569、#619)和 5 例非广东籍患者 VNTR 基因型表明, 菌株均为 SNP 3 型, 且 18-8、12-5 位点的等位基因分别为 7 和 3 个拷贝, 其基因型与表 1 中广东省本地 SNP 1 型和 SNP 3 型菌株不同。因 #569、#619 两例广东籍患者与非广东籍患者菌株基因型接近, 流行病学调查也显示该 2 例患者与非广东籍患者有直接接触史。

3. 感染菌株来源调查: 为分析菌株感染来源调查了 6 例非广东籍患者的迁入年龄、发病年龄及发现延迟期(表 3)。其中患者 #500 原籍江西后迁入广东居住 8 年。该例患者

表 1 广东省 17 例麻疹病患者感染 SNP 1 型和 SNP 3 型菌株的 VNTR 基因型比较

病例号	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	TTC21	18-8	12-5	TA-10	ML-1	SNP
#504	6	11	5	15	8	20	10	5	6	22	23	8	4	7	1	
#505	6	11	4	11	8	16	9	5	6	20	15	7	4	7	2	
#507	7	9	4	10	8	14	11	5	6	24	15	8	5	7	2	
#509	6	10	5	11	9	27	10	5	6	17	17	8	4	7	2	
#510	7	9	5	13	9	14	8	5	7	14	18	8	4	10	2	
#511	6	10	4	12	7	13	10	5	6	17	13	8	4	7	1	
#571	6	10	5	11	9	18	7	5	6	22	15	8	5	7	2	1
#590	6	9	4	14	8	16	10	5	6	18	18	8	4	7	2	
#591	6	9	5	13	8	25	10	5	7	14	18	8	4	7	2	
#596	6	11	5	13	8	14	11	5	6	14	16	/	4	7	2	
#611	6	/	/	10	8	15	9	5	6	15	13	8	4	7	2	
#630	5	10	4	10	7	19	10	5	6	15	18	8	4	7	2	
#631	8	10	4	10	7	19	10	5	6	15	18	8	4	7	2	
#500	7	8	4	12	9	13	9	5	6	17	12	8	4	10	1	
#592	7	10	4	10	9	16	11	5	5	15	15	/	4	9	1	
#484	7	8	4	13	9	11	8	4	6	12	12	8	4	8	1	3
#628	7	15	4	12	8	18	8	5	5	20	13	8	4	11	1	

注: #500 为原江西籍后迁入广东的患者

表 2 2 例广东籍和 5 例非广东籍麻疹病患者感染菌株的 VNTR 基因型

病例号	原籍	AC8b	GTA9	GGT5	AT17	AC9	AT15	AC8a	27-5	6-7	TA18	TTC21	18-8	12-5	TA-10	ML-1	SNP
#569	广东	9	12	4	13	8	22	7	5	9	11	21	7	3	10	1	
#619	广东	7	13	4	13	9	23	11	6	8	16	18	7	3	13	1	
#499	广西	8	13	4	17	8	13	9	5	10	15	36	7	3	15	1	
#503	贵州	8	20	4	13	8	24	10	5	8	17	13	7	3	11	1	3
#595	云南	8	23	4	12	7	14	8	5	10	14	9	7	3	11	1	
#617	贵州	8	40	4	17	9	15	8	5	6	19	17	7	3	12	1	
#633	江西	8	10	5	12	8	13	9	5	5	/	11	4	/	9	1	/

注: 广东籍病例不排除与外省籍病例有接触史

表 3 6 例非广东户籍麻风病患者的迁移史

病例编号	原籍	麻风病接触史	现居住地与迁移史			
			现居住地	诊断地点	迁入年龄/诊断年龄(岁)	迁入与诊断的间隔(年)
#499	广西隆安	无	广东深圳	广东	23/28	5
#500	江西吉安	不明	广东深圳	广东	24/32	8
#503	贵州黎平	有	广东东莞	广东	25/29	4
#595	云南大理	有	广东东莞	云南	46/39*	-
#617	贵州遵义	无	广东中山	广东	29/31	2
#633	江西南昌	有	广东揭阳	广东	6/21	15

注: *曾在原籍确诊,迁入后进一步确诊治疗

病。该例由于无其母的菌株分型资料,加之该患者菌株 SNP 分型不成功,同样难以估计其感染来源。但依据其他 4 例患者的迁入年龄与诊断年龄的间隙期、发现延迟期,以及菌株 VNTR、SNP 基因型(表 2),可推断这些患者感染来源于原居住地菌株基因型。

讨 论

麻风病曾在我国长期广泛流行,但与周边国家间的传播关系并不清楚。2009 年 Monot 等^[4]新确立麻风菌 16 个 SNP 亚型,并研究发现中东的土耳其、伊朗以及中国、韩国、日本菌株均为 SNP 3k 型,而印度、印度尼西亚和菲律宾的菌株多为 SNP 1 型,推论麻风病可能由南北两条路径进入亚洲,即北路始于中东,经土耳其、伊朗,经陆上“丝绸之路”进入中国,再由中国进入韩国、日本。2005 年我国开展了麻风菌株的基因分型,最初研究发现中国菌株 VNTR 小卫星位点缺乏多态性^[5],随后又发现来自我国西南与内地的 32 个菌株均为 SNP 3 型^[6],但在华南沿海地区却发现了 SNP 1 型菌株^[7]。这预示我国麻风病的历史传播并非沿“北路”单一路径,可能存在另一条传播路径^[7]。我国自古既已通过海上“丝绸之路”,与周边国家建立了商贸、移居关系。根据菲律宾等国的麻风菌分型以 SNP 1 型为优势菌株,而我国沿海的 SNP 1 型菌株又与亚洲一些国家的 SNP 1 型菌株一致,推测麻风菌除存在北向的“丝绸之路”传播路径外,可能还存在海上“丝绸之路”南向的传播路径。

本研究表明广东省本地菌株多数为 SNP 1 型,但仍有少数患者为 SNP 3 型。后者的 VNTR 小卫星位点基因型,如在 18-8、12-5 位点分别为 8 和 4 个拷贝,与我国其他地区的 SNP 3 型菌株不同,更接近广东的 SNP 1 型菌株。该 SNP 3 型菌株仅在我国华南的广东、广西、福建和江西地区发现^[7]。本研究依据

移居广东患者的菌株分型,推测这些“输入性病例”的分离菌株仍来源于原居住地,与广东省本地菌株不同。而“输入性病例”是否会对广东省麻风病流行构成影响,还需进一步监测。

(感谢北京市农林科学院玉米研究中心赵久然、易红梅、王凤格提供片段长度分析仪器)

参 考 文 献

- [1] Zheng DC, Li M, Sun XF, et al. Epidemiological analysis and discussion of strategies regarding prevention of leprosy in migrating population in Guangdong province. *J Diag Ther Derm*, 2010, 17(2):152-154. (in Chinese)
郑道城,黎明,孙希凤,等.广东省流动人口麻风病流行病学分析及防治对策. *皮肤病诊疗杂志*, 2010, 17(2):152-154.
- [2] Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, et al. Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(6):1757-1766.
- [3] Sakamuri RM, Kimura M, Li W, et al. Population-based molecular epidemiology of leprosy in Cebu, Philippines. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(9):2844-2854.
- [4] Monot M, Honoré N, Garnier T, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*, 2009, 41(12):1282.
- [5] Weng XM, Wen Y, Tian XJ, et al. Preliminary study on the genotyping of *Mycobacterium leprae* on 50 isolates from China. *Chin J Epidemiol*, 2006, 27(5):402-405. (in Chinese)
翁小满,温艳,田秀君,等.50 株麻风菌株分型的初步研究. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(5):402-405.
- [6] Xing Y, Liu J, Li W, et al. Genotyping of *rhoT* gene and SNP on *M. leprae* isolates in China. *Chin J Leprosy Skin Dis*, 2010, 26(1):5-7. (in Chinese)
邢燕,刘健,李威,等.32 株麻风菌 *rhoT* 基因和 SNP 基因分型. *中国麻风皮肤病杂志*, 2010, 26(1):5-7.
- [7] Weng X, Xing Y, Liu J, et al. Molecular and spatial epidemiology of leprosy in China: novel insights for tracing leprosy in endemic and non endemic provinces. *Infect Genet Evol*, 2013, 14:361-368.

(收稿日期:2012-12-04)

(本文编辑:张林东)