

北京某中学耐药肺结核暴发疫情分子流行病学分析

张秀芝, 徐伟, 张爱洁, 余琴, 魏云芳

北京市朝阳区疾病预防控制中心结防科, 100021

【摘要】 目的 对北京某中学一起耐药肺结核聚集性疫情进行溯源, 为明确传染源, 防止疫情的扩散提供参考。**方法** 采用 PPD 试验、X 线胸片筛查以及痰检方法对此次疫情中的 203 名密切接触人员进行筛查, 判断疫情流行情况; 采用 12 位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA) 和间隔区寡核苷酸方法 (Spoligotyping) 分型对此次疫情分离的 4 株菌株进行分析。**结果** 203 名密切接触人员中, 共发现 7 名病例, 5 名与首发病例同班, 2 名与首发病例宿舍同一楼层。PPD 强阳性率为 21.3% (38/178), 其中首发病例所在班级的 PPD 强阳性率为 66.7% (24/36)。间隔区寡核苷酸方法 (Spoligotyping) 分型结果显示, 4 株临床菌株中 3 株为北京基因型菌株。MLVA 分型结果显示, 4 株菌株中 2 株 12 个位点的拷贝数完全相同, 1 株仅在 Qub11a 位点上相差 1.6 个拷贝, 1 株在 ETR-A 位点和 MIRU27 位点各相差 1 个拷贝数, 其余位点拷贝数均相同。**结论** 此次疫情中 2 例患者的菌株具有同源性, 2 例不具有同源性, 该疫情可能同时存在同源暴发和散发发病 2 种情况。

【关键词】 结核, 肺; 结核菌素试验; 疾病暴发流行; 流行病学研究; 学生

【中图分类号】 R 181.3 R 521 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-9817(2020)08-1247-03

肺结核是长期危害人类健康的慢性呼吸道疾病。学生是结核防治的重点人群, 一旦校园内存在传染源, 极易发生结核病的聚集性疫情。近年来, 基因分型技术已广泛应用于结核病的分子流行病学中, 用于探索结核病传播机制、暴发调查确认、区分再感染与复燃等方面^[1]。2018 年 10 月至 2019 年 9 月, 北京某中学发生一起耐药肺结核聚集性疫情, 为明确此次疫情的传染源, 结合传统流行病学调查, 对分离得到的 4 株结核分枝杆菌分别进行 12 位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA) 分型和间隔区寡核苷酸方法 (Spoligotyping) 分型, 分析菌株间的同源性。

1 对象与方法

1.1 对象 首发病例患者强某, 男, 19 岁, 2015 年入学。入学前曾患结核性胸膜炎, 抗痨治疗半年, 自行停药。2018 年 10 月 19 日因咳嗽咳痰 20 余天入院, 痰涂片检查阳性, 2018 年 10 月 29 日确诊病原学阳性肺结核, 经药敏试验检测, 结果为耐多药肺结核。续发病例罗某 (男, 17 岁) 和向某 (男, 18 岁), 均出生于西藏, 2015 年入学, 与首发病例强某同班同宿舍。2019 年 1 月 8 日罗某因 1 个月前受凉咳嗽, 口服阿奇霉素无效后前往医院就诊, 胸部 CT 左肺上叶见小结节影, 右肺下叶可见点片影, 考虑肺结核可能。向某于 2019 年 1 月 14 日入院, 1 周前无明显诱因出现阵发性咳嗽, 无胸痛和发热, 胸部 CT 显示双肺多发结

节、斑片状影, 疑为肺结核。2 人分别于 2019 年 1 月 21 和 23 日被诊断为病原学阴性肺结核, 与首发病例强某发病间隔 2 个月 17 d 左右。

1.2 密接人员筛查 于 2019 年 1 月 15—23 日对与病例密接的 203 名人员分阶段进行症状筛查、PPD 试验 (北京祥瑞生物制品有限公司, 20 IU) 和 X 线胸片筛查。胸片异常者留取痰标本, 进行痰涂片和痰培养。PPD 试验结果取硬结横径和纵径的平均值来表示, <5 mm 为阴性, ≥15 mm 或者平均直径 <15 mm 伴水疱、双圈、淋巴管炎等为强阳性^[2]。

1.3 菌株来源 4 株结核分枝杆菌分离株为所有肺结核病例痰标本培养株, 经核酸检测 (Gene-Xpert) 为结核分枝杆菌。以结核分枝杆菌标准株 H37Rv 为对照菌株。

1.4 实验方法

1.4.1 仪器与试剂 MasterMix (Beijing TsingKe Biotech Co., Ltd)、DL 1000 DNA Marker (Takara)、琼脂糖、PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶成像仪、Bio Numerics 5.10 分析软件。

1.4.2 基因组 DNA 提取 刮取生长良好的罗氏培养基上的新鲜菌落, 使用 CTAB 法^[3] 提取基因组 DNA。

1.4.3 MLVA 使用 12 位点 MLVA 分析进行分子分型, 12 个位点包括 ETR-A、ETR-C、ETR-D、MIRU10、MIRU16、MIRU27、MIRU31、MIRU40、Mtub21、Mtub30、Mtub38、Qub11a。PCR 扩增采用 25 μL 体系, 其中上、下游引物各 1 μL, 2×Taq PCR Master Mix 13 μL, DNA 模板 4 μL, 纯水 6 μL。反应条件为预变性 94 ℃ 5 min, 变性 94 ℃ 1 min, 退火 62 ℃ 1 min, 延伸 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。实验以

【作者简介】 张秀芝 (1981—), 女, 山东青岛人, 硕士, 主管医师, 主要研究方向为结核病的预防和控制。

H37Rv 株基因组 DNA 为阳性对照,灭菌蒸馏水为阴性对照。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行观察。将每株菌不同位点凝胶图像及其菌株背景资料输入计算机,用软件 BioNumerics (Version 5.10) 进行分析,计算出各个位点的分子量和重复次数,进行聚类分析。

1.4.4 Spoligotyping 本实验所使用的生物素标记的引物 DRa (5, -GGTTTTGGGTCTGACGAC -3) 和 DRb (5, -CCGAGAGGGGACGGAAC -3) 扩增结核杆菌同向重复序列。将 PCR 产物与制备好的包含有 43 个寡核苷酸探针的杂交膜进行杂交,结果采用二进制形式,通过 SpoIDB4 数据库进行比对分析^[4]。

2 结果

2.1 流行病学调查结果 根据《肺结核诊断 WS 288—2017》^[5],结合痰检结果和影像学检查,203 名密切接触者中共发现 7 名肺结核病例。其中筛查发现 6 例,另外 1 例为因症就诊发现;2 月确诊 4 名病例,3 月

确诊 3 名病例。10 名病例(包括 1 名首发病例、2 名续发病例和筛查发现的 7 名病例)中,7 例是 1501 班学生,与首发病例同一班级;另 2 例是 1704 班学生,与首发病例宿舍位于同一楼层。发病人群集中在与首发病例学习和住宿有交集的学生群体。

203 名密接人员中 181 名进行了 PPD 试验,其中 38 名为单纯性 PPD 强阳性,强阳性率为 21.3%,首发病例所在班级的 PPD 强阳性率为 66.7%。1501 班、1502 班、1503 班、1704 班和教职员工 PPD 强阳性率分别为 66.7% (24/36), 13.2% (5/38), 15.6% (5/32), 7.9% (3/38), 4.2% (1/24), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 50.86, P < 0.05$)。

2.2 MLVA 结果 通过对 4 株菌株进行 MLVA 基因分型,发现 A、B 菌株 12 个位点的拷贝数完全相同,C 菌株仅在 Qub11a 位点上相差 1.6 个拷贝,D 菌株在 ETR-A 位点和 MIRU27 位点各相差 1 个拷贝数,其余位点拷贝数均相同。见表 1。

表 1 4 株菌株 12 个位点的 MLVA 基因分型结果

菌株	ETR-A	ETR-C	ETR-D	MIRU10	MIRU16	MIRU27	MIRU31	MIRU40	Mtub21	Mtub30	Mtub38	Qub11a
A	4.3	4.0	3.3	3.0	2.0	3.0	5.8	2.7	3.6	3.7	1.2	7.2
B	4.3	4.0	3.3	3.0	2.0	3.0	5.8	2.7	3.6	3.7	1.2	7.2
C	4.3	4.0	3.3	3.0	2.0	3.0	5.8	2.7	3.6	3.7	1.2	8.8
D	3.3	4.0	3.3	3.0	2.0	2.0	5.8	2.7	3.6	3.7	1.2	7.2
H37RV	3.0	4.0	3.3	3.0	2.0	3.0	3.0	1.0	2.0	2.0	2.7	3.0

2.3 Spoligotyping 结果 A、B、C 株是北京基因型菌株,D 株无结果。

3 讨论

学校是典型的群体环境,一旦有肺结核患者,发生群体传播的风险较高。本次疫情流行病学调查结果倾向于由首发病例就诊延误造成的近期传播。首发病例所在 1501 班学生 2019 年 1 月份筛查 PPD 试验强阳性率高达 66.7%。查找该校新生入学结核病筛查资料,1501 班、1502 班、1503 班和 1704 班学生 PPD 强阳性率在 0~4.8% 之间;2018 年 10 月 22 日首发病例强某发病后,对其所在班级的密接人员进行筛查,PPD 强阳性率仅为 2.0%,未发现新病例。且 2018 年该校师生只有强某 1 例活动性肺结核,病原学阳性,初步考虑为强某造成同班同学的高感染率,2018 年 10 月筛查时该班学生正处于结核病感染的窗口期。1501 班强阳性率最高,与其他 3 个班级相比差异有统计学意义;与入学筛查时相比,3 个班的 PPD 强阳性率略有升高。除菌株 C 的患者与首发病例同班外,菌株 B、D 的患者与首发病例宿舍在同一楼层,共用洗漱间,不能排除两者之间的流行病学关系。为进一步明确传染源,对该 4 株菌株进行分子流行病学检测。

MLVA 是多位点数目可变串联重复序列分析 (MI-

RU-VNTR) 的一种,是根据不同位点散在重复单位数目的不同进行分型^[6-7]。该技术由于操作简便,结果便于分析及不同实验室之间进行比较^[8],目前已广泛应用于结核病流行病学调查^[9-10]。间隔区寡核苷酸分型是通过检测结核分枝杆菌基因组中 43 个同向重复序列是否缺失进行分型的方法,是鉴定北京家族基因型的金标准^[11]。2 种分型方法经常联合使用,具有较高的分辨力^[12]。本研究中 Spoligotyping 分型结果显示 A、B、C 3 株菌群为北京基因型,D 株无结果,其原因可能与试验菌量不足或该菌株中含有杂菌等因素有关。MLVA 分型 A、B 2 株菌株 12 个位点的拷贝数完全相同,提示 A、B 菌株的同源性较高,可能存在近期传播。C 菌株病例与首发病例同班,D 菌株病例与首发病例宿舍位于同一楼层,但是两者 MLVA 分型结果均不相同,提示疫情中部分病例可能为散发病例。经调查,该校为寄宿制学校,1501 班为高三毕业班,可能与学习压力大、缺乏体育锻炼、免疫力低下等多种因素促使内源性感染者发病有关。因此,将结核病分子诊断技术应用到结核病筛查工作中,有利于及时确定传染源,便于后期采取适当的防控措施。

有研究显示,首发病例延误诊断、密切接触者拒绝预防性服药和随访不足是导致学校结核病疫情进一步发展或者暴发的主要因素^[13]。本起疫情发生的

主要原因是首发病例就诊延迟,学校作为学生在校监护人没有及时督促学生就医。因此,要加强学校结核病防治知识的健康教育,提高社会公众对结核病防治知识的了解^[14];做好症状监测等关键环节,及时发现可疑病例,做到及时隔离,尽快诊断和治疗,防止疫情的进一步扩散。

4 参考文献

- [1] 段琼红,陈军,王卫华.MIRU-VNTR 在耐多药结核病分子流行病学中的应用进展[J].公共卫生与预防医学,2018,29(5):85-88.
- [2] 成诗明,王国治,王黎霞,等.结核菌素皮肤试验使用指导手册[M].北京:人民卫生出版社,2014.
- [3] BABAMAHMOODI F, MAHDAVI M R, JALALI H, et al. Evaluation of gene mutations involved in drug resistance in mycobacterium tuberculosis strains derived from tuberculosis patients in Mazandaran, Iran, 2013[J]. Int J Molecul Cellul Med, 2014, 3(3):190-195.
- [4] YIMER S A, HAILU E, DERESE Y, et al. Spoligotyping of mycobacterium tuberculosis isolates among pulmonary tuberculosis patients in Amhara Region, Ethiopia [J]. Acta Patholmicrobioloet Immunol Scand, 2013, 121(9):878-885.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.肺结核诊断 WS 288—2017[S]. 2018-05-01.
- [6] GUTHRIE J L, KONG C, ROTH D, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in British Columbia, Canada; a 10-year retrospective study [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(6):849-856.
- [7] MANSOORI N, YASERI M, VAZIRI F, et al. Genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis complex isolates circulating in an area with high tuberculosis incidence; using 24-locus MIRU-VNTR method[J]. Tuberculosis(Edinb), 2018, 112:89-97. DOI: 10.1016/j.tube.2018.08.003.
- [8] 郭立娟,黄海荣,高飞,等.北京家族结核分枝杆菌鉴定方法的研究进展[J].中国防痨杂志,2016,38(2):151.
- [9] 李玉新,王鸣秋,周丽平,等.一起学校结核病暴发疫情临床株基因同源性分析[J].公共卫生与预防医学,2013,24(3):99-100.
- [10] 李静,江渊,唐利红,等.上海市某高级中学学生结核病疫情的分子流行病学分析[J].中国防痨杂志,2017,39(5):506-510.
- [11] RORING S, HUGHES M S, SKUCE R A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium bovis directly from bovine tissue specimens by spoligotyping[J]. Vet Microbiol, 2000, 74(3):227.
- [12] 石洁,郑丹薇,朱岩昆,等.河南省结核分枝杆菌 MIRU-VNTR 和间隔区寡核苷酸分型分析[J].郑州大学学报(医学版),2019,54(3):426.
- [13] 黄玉,钟节鸣,张钰,等.浙江省一起校内肺结核聚集性疫情爆发原因及影响因素调查[J].中华流行病学杂志,2015,36(2):172-175.
- [14] 曹宏伟,王红波,孙蕾,等.辽宁省两县中小学结核病健康教育效果评价[J].中国防痨杂志,2014,36(12):1098-1100.

收稿日期:2020-03-02;修回日期:2020-04-02