中华流行病学杂志1987年第8卷第5期

质粒分析、噬菌体定型及耐药谱测定在伤寒流行病学调查中的应用

肖黔林[1]　周忠海[1]　李秋丽[2]　巩志业[2]　谢全美[1]　张世达[1]　王瑞华[1]
杨昌伦[1]　刘大西[1]　汪　凯[1]　柯应龙[3]　李观聪[3]　王枢群[2]（指导）

提要　用质粒分析、噬菌体定型、耐药谱测定这三种方法检查了贵州省安顺地区一九八五年十月伤寒爆发流行期和一九八六年春夏季分离的伤寒沙门氏菌。结合流行病学分析，看出质粒分析及噬菌体定型是检定流行菌株特点的有用方法。尤其质粒分析，在同流行病学资料的符合性，操作方法简易方面优于噬菌体定型，而耐药谱的应用则有很大的局限性，通过质粒分析及噬菌体定型，明确看出一九八五年爆发流行主要是由携带100Md质粒的菌株或噬菌体定型为M_1型的伤寒沙门氏菌所引起。一九八六年的病例仍然是这种菌株在起主导作用。同时也指出，该地区仍有个别病例属其它细菌克隆所致。

关键词　质粒分析　噬菌体定型　耐药谱测定　伤寒沙门氏菌

一种传染病的一次流行，所涉及的病原体常常不是一个来源。过去主要是用生化及血清学反应来区别各种型别，即生化型及血清型。后来人们认识到流行菌株在对噬菌体和抗生素的敏感性上，可有不同，从而出现噬菌体型和耐药谱型。这两种方法已广泛采用多年。在八十年代以来，利用流行菌株所带质粒的特点来加以区别，出现了质粒图谱分析。

伤寒在我国仍然是主要传染病之一。尤其在本地，伤寒时有流行，甚至爆发流行。以往使用噬菌体定型以明确菌株特点和发现各菌株间的关系，以弄清流行病学问题。进入80年代以来，质粒分析逐渐用于流行病学研究中。这种方法曾广泛用于各种细菌，如表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、明斯特沙门氏菌(S.muenster)、军团热菌、鼠伤寒沙门氏菌、慕尼黑沙门氏菌（S.muenchen）及弯曲菌等感染的调查[1~7]。但尚未见到质粒分析用于伤寒沙门氏菌的流行病学调查。本文针对1985年本地区发生的爆发流行和1986年小范围爆发流行及散在病例所分离的170余株菌株，进行了质粒分析、噬菌体定型及耐药谱测定，比较它们在流行病学上应用的情况。

材料和方法

一、菌株来源：留取1985年流行期从安顺市伤寒病患者血液或大便标本中分离的伤寒菌86株；1986年4～8月从安顺地区清正县、息烽县、平坝县、安顺县等局部流行点及安顺市腹泻监测标本中分离获得的伤寒菌84株。

对照用菌株17株。10株系1983年从安顺地区普定县分离；2株系1985年流行前从镇宁县分离；5株系1985年流行前从安顺市分离。

全部菌株经生化反应及血清学鉴定，均符合Kauffmann伤寒沙门氏菌特性。

二、药敏试验：对1985年分离的菌株及对照株用平皿稀释法测定，使用了六种抗生素。对各药的耐药标准是：氯霉素（Cm）、四环素（Tc）及氨苄青霉素（Ap)为50μg/ml；链霉素（Sm）为20μg／ml；先锋霉素1号、4

1　贵州省安顺地区卫生防疫站
2　中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
3　贵州省安顺地区卫生局

号（Cp1·Cp4）为10μg／ml。药品由北京药品生物制品检定所提供。

对1986年分离的菌株改用上海医立化验所生产的药敏纸片计11种：即Cm、TC、Ap、Sm、Cp、庆大霉素（Gm）、卡那霉素（Km）、新霉素（Nm）、红霉素（Em）、复方新诺明（SMZ）、丁胺卡那霉素(AKN)，方法及结果判定按文献[8]。

培养基均采用上海医立化验所生产的营养琼脂粉制作。

三、噬菌体定型：1985年的菌株噬菌体定型由贵州省卫生防疫站进行；1986年菌株定型工作在河南省卫生防疫站进行。

四、质粒分析：质粒DNA提取采用Birnboim法[9]。被检菌株在普通肉汤中置37℃过夜培养后，取1.5ml菌液按Birnboim法进行提取。取适量DNA在0.7%琼脂糖凝胶板上进行平板电泳，电泳液为TBE，电压为4-5 V/cm，在电泳板两侧边孔加相同的已知分子量大小的参考DNA，(PDK9 105，140Md，R1 62Md及λDNA，EcoR I 酶切片段）。电泳后EB染色，然后在紫外线灯下进行拍照，按Southern[10]法进行分子量测定。

结　果

一、质粒分析：全部菌株质粒分析结果(表1)指出，带有100Md质粒的菌株是1985年爆发流行及1986年感染大批病例的主要菌株。分别占93.0%和88.1%。在17株保存菌株中，仅一株带有100Md质粒。

二、噬菌体定型：1985年菌株绝大部分(97.3%)为M_1型，而1986年M_1型菌株占78.5%；其余为D_2，占15.4%；E_1占6.1%，见表2。

三、耐药谱测定：被检菌株的耐药谱颇为复杂。1985年流行期分离的伤寒菌对Cp4号敏感（MIC＜10μg／ml），对其余抗生素表现出六种耐药类型(见表3)。1986年分离菌株，对丁胺卡那霉素、庆大霉素呈现敏感结果，对所使用的其它抗生素耐药谱表现出七个类型（表3）。

表1　全部菌株携带质粒情况

质粒 (Md)	1985年 菌株	(%)	1986年 菌株	(%)	保存 菌株	(%)
100	80	(93.0)	74	(88.1)	1*	(5.9)
100,68			1	(1.2)		
100,48			1	(1.2)		
90			3	(3.6)		
70,54,39,27	1	(1.2)				
60	3	(3.5)	1	(1.2)		
无质粒	2	(2.3)	4	(4.8)	16	(94.1)
合计	86		84		17	

* 85年流行前9月份从安顺市分离

表2　139株伤寒沙门氏菌噬菌体定型

分离时间	检查数	噬菌体型 M1(%)	D2(%)	E1(%)	不裂解(%)
1985年	74	72(97.3)			2(2.7)
1986年	65	51(78.5)	10(15.4)	4(6.1)	

表3　1985年流行期分离的伤寒杆菌及保存菌株的耐药类型

1985年分离菌株 耐药类型	菌株数	保存菌株 耐药类型	菌株数
Cm	1	Ap	1
Cm Tc Ap	1	Cm Tc Sm Ap Cp1	1
Tc Ap Cp1	1	susceptible	15
Cm Ap Cp1	8		
Cm Tc Ap Cp1	38		
Cm Tc Sm Ap Cp1	2		
	51		17

四、三种检查结果的关系：为了观察这三种检查方法互相间是否有某种联系，凡做过三种检查的菌株归並一起进行分析，结果未发现有意义的联系。

五、各种检查方法的流行病学意义

1.质粒分析：由表1可知，在安顺市1985年发生伤寒流行前，存在的菌株绝大部分是不带质粒的。仅个别菌株带有100Md质粒，这个菌株恰恰是流行前夕从伤寒患者分离的菌株。而

表4　1986年安顺地区不同地点分离的75株伤寒菌耐药类型

分离地点	分离时间	耐药类型*								
		A	B	C	D	E	F	G	H	合计
清正县沙娥乡	1986.4								3	3
息烽县蚕桑坡	1986.5～6	11								11
平坝县乐平乡	1986.5	4								4
安顺县三军乡	1986.5～6		12							12
安顺县二卜乡	1986.5～6	6		1	1	7				15
安顺市	1986.4～8	7	9		6	6	1	1		30
合计		28	21	1	7	13	1	1	3	75

*: A: Cm SmZ Ap Cp Sm Em Tc
B: Cm SmZ Ap Cp Nm Km Em Tc
C: Cm SmZ Sm Em
D: Cm SmZ Ap Em Tc
E: Cm SmZ Ap Sm Em Tc
F: SmZ Em
G: Cm SmZ Ap Cp Sm Nm Km Em Tc
H: susceptible

1985年流行后，带100Md质粒的菌株剧增。由此可以认为，带100Md质粒的菌株，在流行前就在社会上引起散发病例，该次爆发流行也是由这种带100Md质粒的菌株引起。结合该次流行的流行病学资料分析，引起爆发的带100Md质粒的菌株污染了饮用水源从而感染大批人群。与此同时，也还有个别带其它质粒的菌株引起散在的感染。1986年，虽然未发生1985年那样的爆发流行，可是发病仍较严重。从菌株质粒携带情况看，带100Md质粒的菌株比例数稍有下降，但仍为优势菌株。从该菌株在1985年和1986年流行中所起的作用来看，没有显著差别（$\chi^2=1.21$；$P>0.05$）。这就说明1985年广为散布的带100Md质粒的菌株，仍在感染大量人群。

尤其值得提出的是，清正县沙娥乡是一偏僻山村，所分离的3株伤寒沙门氏菌均不带质粒，说明该地患者与各爆发流行点的菌株没有关系。

2.噬菌体定型：1985年爆发流行中分离的菌株，有97.3%为M1型，说明该次流行系由M1噬菌体型菌株造成；而1986年的情况是M1型下降，占78.5%（$\chi^2=12.02$，$P<0.01$）。表明M1型菌株虽仍为主要菌株，但其作用已明显下降。

3.耐药谱测定：绝大部分菌株均为多重耐药菌。表4表明，从局部流行点上看，一般仍以某一耐药类型的菌株为主，可以看出菌株之间的关系。但在城市及交通方便的乡镇（如安顺县二卜乡），则菌株的耐药类型更为复杂，菌株间的关系不十分明显。

讨　论

本文所比较的三种方法，质粒分析及噬菌体定型均可明确地说明流行病学问题。如从清正县沙娥村患者分离的菌株与带100Md的菌株无任何联系，这与流行病学调查与其它各流行点无流行病学联系的推论相吻合，平坝县乐平乡、息烽县蚕桑坡、安顺县三军乡、二卜乡及安顺市均有明显的流行病学联系，与质粒分析及噬菌体定型的结果相一致。二者比较之下，质粒分析似更为简便，细致。噬菌体定型操作繁杂，如菌株无Vi抗原，定型则受到限制，本次有5株Vi抗原阴性菌株，噬菌体不能进行定型，却获得质粒分析结果；相反，不带质粒的菌株，却可用噬菌体定出型别。表1、表2同时也表明，所有菌株，质粒分析可有七个类型，噬菌体定型有三个型别，说明前者更为细致。

在流行病学调查中，若能两种方法同时並用，则更能全面地了解菌株之间的关系。

用测定细菌耐药谱的方法来分析菌株间的关系，则受到很大限制。在像我区这样的伤寒高发地区，特别是在医疗条件稍好，交通较为便利的地方，因大量使用或滥用抗生素，菌株的耐药谱更为复杂，不易看出菌株间的关系。如果在小范围的局部地区流行，耐药谱测定的结果也能说明一定问题。由于耐药谱测定易受许多因素的影响，故在伤寒流行病学调查中，不及质粒分析及噬菌体定型两种方法。

（参加工作的同志还有黄杰　张波　焦燕　陈英　刘海芬　李再林）

A Comparison Study on the Application of Plasmid Profile Analysis, Phagetyping and Antimicrobial Susceptibility Testing to the Epidemiological Investigation of Typhosaid

Xiao Qianlin, et al., Anshun District Sanitary and Epidemic Station, Guizhou Province

Plasmid profile analysis, phagetyping and antimicrobial susceptibility pattern have been used to analyse the strains of S. typhoid isolated during the epidemic happened in October, 1985 and in the period of spring-summer, 1986 in An Shun Prefecture of Guizhou Province. In combination with epidemiological analysis, it was shown that plasmid profile analysis and phagetyping proved useful methods in detecting the characteristics of prevailing strains. In terms of finding the coincidence with the epidemiological data and easiness of performance, plasmid profile as found better than phagetyping. But the antimicrobiol susceptibility pattern gave an unsatisfactory result.

According to the result of plasmid profile analysis, it was clearly seen that the strain clone witn 100Md plasmid was the main causative agent for the epidemic. And strains with phagety pen M1 were found the principal pathogens for the epidemic on the basis of phagetyping. The same strains still caused sporadic typhoid in 1986. But it was also found that there were some other strain clones causing isolated cases.

Key words Plasmid profile analysis-Phagetyping Antimicrobial susceptibility pattern Salmonella typhoid

参 考 文 献

1. Archer GL, et al. Plasmid pattern analysis for the differentiation of infecting from non-infecting Staphylococcus epidermidis. J Inf Dis 1984; 149: 913.
2. Bezanson GS, et al. Plasmid profiles of value in differentiating Salmonella muenster isolates. J Clin Microbiol 1983; 17: 1159.
3. Brown A, et al. Plasmid and surface antigen markers of endemic and epidemic Legionella pneumophila strains. J Clin Microbiol 1982; 16: 230.
4. Holmberg SD, et al. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing and antimicrobial susceptibilty testing in characterizing Salmonella typhimurium isolates from outbreak. J Clin Microbiol 1984; 19: 100.
5. McGowan JE, et al. Nonocomial infections with gentamycin-resistant Staphylococcus aureus: plasmid analysis as an epidemiological tool. J Inf Dis 1979; 140: 864.
6. Taylor DN, et al. Salmonellosis associated with marijuana. N Engl J Med 1982; 306: 1249.
7. Tenover FC, et al. Utility of plasmid fingerprinting for epidemiological studies of Campylobacter jejuni infections. J Inf Dis 1984; 149: 279.
8. 福州部队总医院. 临床医学检验. 上海科学技术出版社. 1978.
9. Birnboim HC, et al. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979; 7: 1513.
10. Southern E. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods in Enzymology. Vol. 68, p.152, 1979.

（贵州省防疫站、河南省防疫站流行病科对本工作大力支持，特此致谢）