

我国伤寒沙门氏菌的分子流行病学特征

I. 我国部分地区伤寒沙门氏菌的多位点酶电泳研究

徐文斌 祁国明 刘延清

摘要 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析了我国部分伤寒高发省份在不同年代分离到的335株伤寒菌的七种染色体编码的多位点代谢酶。结果发现这七个酶位点均有多态性。其平均等位基因数为7.4 (2~19); 平均遗传多态度为0.498 (0.198~0.833)。335株伤寒菌的七个酶位点电泳结果通过排序和数值分类可分为147个不同的电泳型 (ETs)。根据对ETs进行聚类分析以及聚类时不相似系数曲线变化情况, 把147个ETs归属于22个不同的亚克隆系, 12个克隆系。进一步的分析发现, 不同地区、不同年代、不同来源的菌株有其规律性, 1988年的江苏、浙江菌株大都来自同一克隆系; 1990年的广西菌株和1990年的部分湖北菌株也为同一个克隆系菌株。不同年代分离的湖南和贵州菌株之间具有较近的亲缘性; 而新疆菌株则有相对的独立性。同时结果还显示同一次伤寒爆发或流行中分离到的菌株均来自一个亚克隆系。

关键词 伤寒沙门氏菌 多位点酶电泳 分子流行病学

根据我国部分地区对伤寒菌株的噬菌体分型发现, 我国伤寒菌株的型别较多, 进一步的分析还发现, 同一地区不同年代的伤寒菌型也有变化, 如江苏M₁型伤寒沙门氏菌在1987年的所检菌株中占89.5%, 而在以后的1988、1989、1990和1991年的所检菌株中分别为55.3%、24.6%、30.8%和13.8%, 可见国内伤寒流行菌型的复杂性。为更好地研究各地区伤寒流行的内在联系, 从分子水平探讨国内不同地区和时间伤寒流行之间的关系, 我们采用在分类学、群体遗传学和分子流行病学上应用较多的多位点酶电泳 (Multilocus Enzyme Electrophoresis, MEE) 方法^[1,2], 对新疆等八个高发省、市、自治区分离的335株伤寒沙门氏菌七种染色体编码的代谢酶进行多态性分析。

材料与方 法

一、实验用菌株: 实验用菌株是从新疆等八个高发省、市、自治区分离的335株伤寒沙门氏菌, 另有1株鼠伤寒沙门氏菌 (表1)。

二、所选酶及反应试剂: 通过预实验, 选

出七种染色体编码的代谢酶。这些酶均为多位点同工酶, 活性高, 结果稳定 (表2), 反应试剂购自中国医药总公司北京化学试剂商店。

三、实验方法:

1. 酶的提取与保存: 参照文献^[1]进行。
2. 酶电泳: 采用聚丙烯酰胺凝胶 (Polyacrylamide Gel, PAG) 对不同大小的酶分子进行电泳分离。选用的上胶浓度为2.5%, 交联度为20% (含20%蔗糖)、下胶除GOT用浓度6.5%的PAG外, 其余六种酶均用5.0%, 交联度则均是2.6%。样本缓冲液为含0.1%溴酚蓝的10%蔗糖溶液; 电泳缓冲液采用TBE系统。每次电泳都加参考标准株Ty 2作对照。
3. 酶特异性染色: 基本步骤及配方参照文献^[1,3]。
4. 读胶: 对于只有一条电泳带的酶位点, 分别记录每个菌株该酶的迁移距离, 以同一胶上的标准株Ty 2作对照, 计算出每个菌株该酶的相对迁移率; 对于在PAG上存在多条电泳

本文作者单位: 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 102206 北京市

• 本题目为国家自然科学基金资助课题

表1 实验用菌株及有关资料

| 编 号 | 分离地区 | 分离年代 | 简写代号 | 有关背景资料 |
|----------|------|-----------|------|---|
| 1~8* | | | B | 国际标准菌株。 |
| 9~10** | | | B | 9为Ty2, 10为Ty21a。 |
| 11~26** | 湖北 | 1990 | HB | |
| 27~56** | 广西 | 1990 | GX | |
| 64~82** | 大连 | 1990 | DL | 大连金州区1990年爆发菌株。 |
| 83~92** | 浙江 | 1988 | [ZJ | |
| 93~111** | 江苏 | 1988 | JS | |
| 112~268 | 新疆 | 1981~1991 | XJ | 其中140~221为1991年伊犁市流行菌株, 134~137、254~265为1990年哈密铁路防疫站分离到的流行株, 251为1990年从健康带菌者分离到的菌株。 |
| 269~304 | 湖南 | 1987~1992 | HN | |
| 57~63 | 贵州 | 1959~1991 | GZ | 其中305~315是1959年分离到的菌株, 334为鼠伤寒沙门氏菌。 |
| 305~363 | | | | |

* 来源于中国药品生物制品检定所; ** 来源于中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所。

表2 选用酶及反应试剂

| 国际分类标准 | 酶 | 代号 | 反应底物 | 辅酶 | 染色试剂 |
|-----------|-----------|-------|-----------------------------|------|----------------------|
| 1.1.1.1 | 乙醇脱氢酶 | ADH | 无水乙醇 | NAD | MTT.PMS |
| 1.1.1.2 7 | 乳酸脱氢酶 | LDH | 乳酸锂 | NAD | MTT.PMS |
| 1.1.1.3 7 | 苹果酸脱氢酶 | MDH | DL-苹果酸 | NAD | MTT.PMS |
| 1.1.1.4 9 | 葡萄糖6磷酸脱氢酶 | G6PD | 葡萄糖6磷酸二钠盐 | NADP | MTT.PMS |
| 1.4.1.2 | 谷氨酸脱氢酶 I | GD I | DL-谷氨酸 | NAD | MTT.PMS |
| 1.4.1.4 | 谷氨酸脱氢酶 II | GD II | DL-谷氨酸 | NADP | MTT.PMS |
| 2.6.1.1 | 谷草转氨酶 | GOT | L-天冬氨酸 α-酮戊二酸 5-磷酸吡哆醛 | -- | Fast Blue BB Salt |

带的酶位点, 分别记录每个菌株每条带的迁移情况, 以同一胶的标准株Ty2为参照进行标化, 得到每个菌株该酶位点的综合相对迁移情况; 对缺乏某酶位点电泳带的菌株, 该菌株的此酶位点记录为0。

5. 排序及数值分类: 对单酶位点的菌株, 把计算好的相对迁移率从小到大排列, 分别按1、2、3、4……进行编号; 对多酶位点的菌株, 把标化好的综合相对迁移情况按一定顺序排列, 编号为1、2、3、4……。不同菌株在某酶位点的迁移情况相同则编号相同, 酶位点缺乏者编号为0。这样每个菌株的各个酶位点便

有相应的数值编号, 我们把代表相应酶位点的这样一组数值排列称为该菌株的电泳型(Electrophoretic Type, ET)。

6. 资料的统计分析:

- (1) 等位基因频率 (f)
- (2) 遗传多态度 (Genetic diversity, h)
- (3) 平均遗传多态度 (Mean genetic diversity, H)
- (4) 不相似系数 (Unsimilarity coefficient, U)

上述指标计算方法见文献 [1]。

7. ETs聚类分析 [4]：采用 SYSTAT 软件包中 CLUSTER 模块，通过平均连接法 (Average-linkage method) 对所有 ETs 进行聚类。

结 果

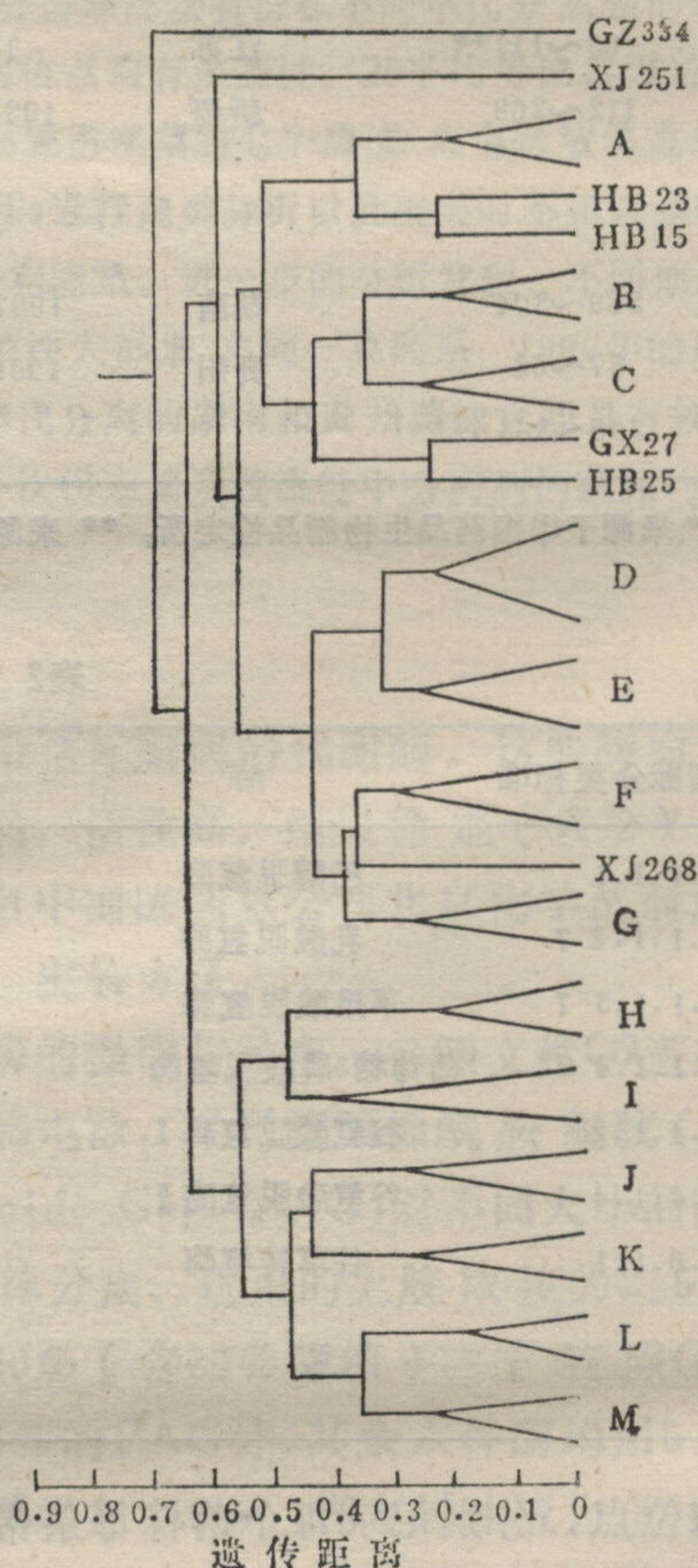
一、酶位点变异：所有酶位点都有多态性，其中 G6PD 变异最大，等位基因数为 19，遗传多态度为 0.8880；ADH 变异最小，只有 2 个等位基因，遗传多态度为 0.2975；7 个酶位点平均等位基因数为 7.43，平均遗传多态度为 0.5829。

二、不同来源菌株情况：通过对各省菌株分析，发现不同地区菌株在各酶位点的等位基因数、遗传多态度上均存在很大差异。其中新疆菌株的平均等位基因数最多，为 5.86；其次是贵州菌株，为 4.58；大连 1990 年爆发菌株和浙江 1988 年菌株最少，为 1.71；湖南、湖北、广西、江苏菌株分别为 3.00、2.71、2.71 和 2.57。平均遗传多态度，湖北 1990 年菌株最大，为 0.492；其次是贵州菌株，为 0.485；大连 1990 年爆发菌株最小，只有 0.235；江苏、湖南、新疆、广西、浙江菌株分别为 0.453、0.395、0.354、0.308 和 0.286。

三、ET 分布：根据对实验结果的排序和数值分类，335 株伤寒沙门氏菌和 1 株鼠伤寒沙门氏菌可分为 147 个 ETs。大多数 ET 内只有一个菌株 (59.9%)；来自不同地区的菌株只有少数 (9.5%) ET 相同。也有多个菌株同属于一个 ET 的情况，如新疆伊犁市 1991 年流行的 81 株伤寒菌有 63 株集中在 7 个主要的 ETs 内；大连 1990 年爆发菌株也主要集中在 2 个 ETs 内 (16/18)；广西 1990 年菌株也较为集中；而湖南、湖北、贵州及新疆散发菌株分布较为分散，大多数菌株具有自己独特的 ET。

四、ETs 的聚类及克隆系的划分：把每个 ET 所对应的数值输入计算机进行聚类，得到树状图 (附图)。根据聚类分析对 ET 间的不相似系数 U 与各级聚类之间的关系。同时参照

分析菌株的流行病学背景资料，我们选择 $U=0.40$ 处， $U=0.295$ 处作为本次 MEE 分析克隆系，亚克隆系划分的界限值。结果 335 株伤寒菌分属 12 个克隆系，22 个亚克隆系，1 株鼠伤寒沙门氏菌为单一克隆系。从附图中可以看出，一个克隆系中可能存在多个亚克隆 (表 3)。



附图 聚类树状图

讨 论

一、我国伤寒菌株多位点同工酶的多态性：不同地区、时间和流行方式分离出的伤寒菌株在各酶位点的等位基因数、遗传多态度方面存在一定差异。如大连 1990 年分离的爆发菌株在 LDH、GOT、ADH、GDI 位点具有相同的等位基因，等位基因数均为 1；新疆伊犁 1991 年的流行菌株也有类似情况。

表3 聚类图例说明

| 符 号 | 克隆概念 | 所含菌株来源及背景 |
|------------|------|-------------------------|
| GZ334 | 克 隆 | 贵州1984年分离的1株鼠伤寒沙门氏菌 |
| XJ251 | 克 隆 | 新疆1990年从健康带菌者分离的菌株 |
| A | 亚克隆 | 大连1990年爆发菌株 |
| HB15, 23 | 亚克隆 | 湖北1990年菌株 |
| B | 亚克隆 | 江苏1988年菌株 |
| C | 亚克隆 | 江苏1988年菌株、浙江1988年菌株 |
| HB25, GX27 | 亚克隆 | 广西1990年菌株27、湖北1990年菌株25 |
| D | 亚克隆 | 新疆伊犁市1991年大流行菌株 |
| E | 亚克隆 | 新疆不同地区 年代的部分散发菌株 |
| F | 克 隆 | 新疆不同地区、年代的部分散发菌株 |
| XJ268 | 克 隆 | 新疆1988年克州的分离菌株 |
| G | 克 隆 | 新疆不同地区、年代的部分散发菌株 |
| H | 亚克隆 | 新疆哈密铁路防疫站1990年分离的流行株 |
| I | 克 隆 | 贵州、湖南不同地区、年代的部分菌株 |
| J | 克 隆 | 贵州、湖南不同地区、年代的部分菌株 |
| K | 克 隆 | 贵州、湖南不同地区、年代的部分菌株 |
| L | 亚克隆 | 广西1990年菌株 |
| M | 亚克隆 | 广西1990年菌株、湖北1990年菌株 |

注：A~M为含有多个分析菌株的克隆或亚克隆代号。

各酶位点在不同省份菌株间的等位基因也不相同，如LDH位点，大连1990年的18个爆发菌株均为LDH1，而江苏1988年菌株则83.3% (15/18) 为LDH3；MDH位点，浙江1988年的9个菌株全为MDH1，而广西1990年菌株有96.3% (26/27) 为MDH2。

平均等位基因数和平均遗传多态度，大连1990年爆发菌株最少，而湖北1990年、新疆1981~1991年、贵州1959年和1981~1991年菌株则较多。

通过对上述指标的统计分析，可以发现，平均等位基因数越少、平均遗传多态度越小，则分析菌株的亲缘性越高、遗传距离越近。从不同来源菌株多位点同工酶的多态性分析，可得知不同地区、时间分离菌株大致的遗传背景，从而推测不同地区、时间伤寒流行之间的可能联系。

二、我国伤寒沙门氏菌株的群体遗传结构：
对335株伤寒菌株的七个酶位点的不同等位基

因情况进行分析、聚类，可以看出不同来源菌株的群体遗传结构（附图，表3）。

从地区分布来看，高发省份之间在地理上存在相关性。如江苏、浙江菌株亲缘关系较近，两省1988年的菌株大多(23/27) 来自一个克隆系；新疆、大连菌株有各自的克隆系；湖南、贵州、湖北菌株则比较复杂，而其中湖南、贵州两省菌株遗传距离较近，存在着几个共同的克隆系，同时在其他地区克隆系中也发现有两省菌株。

从时间分布来看，分离年代相隔越远的菌株，遗传背景相差越大。如新疆1981~1991年的153株伤寒菌，有69个ETs，3个主要的克隆系，8个亚克隆系；湖南1987~1992年的32个菌株就有23个ETs；贵州1959年和1981~1991年的63株伤寒菌有46个ETs，两省菌株有4个克隆系；而江苏、浙江省1988年的大部分菌株则来自一个克隆系。

从不同流行方式分离出菌株的情况来看，

一个地区同一次爆发或流行菌株均为一个亚克隆系内的菌株,如大连1990年的爆发菌株和伊犁1991年的流行菌株。而从散发病例、带菌者分离的菌株则比较复杂;有时从一个健康带菌者分离出的菌株(XJ251)为一个独立的克隆系。

可见,我国各地区伤寒沙门氏菌存在着复杂的群体遗传结构,与复杂的噬菌体型相一致。

对贵州的1株鼠伤寒沙门氏菌(GJ334)分析发现,它与伤寒沙门氏菌在遗传背景上相差甚远,完全不同于伤寒沙门氏菌的克隆系。

三、我国伤寒沙门氏菌克隆系分布特点:从我国部分高发地区伤寒沙门氏菌的复杂群体遗传结构和众多的克隆系分布可以看到:伤寒在我国部分地区的长期存在,导致伤寒菌株的不断分化,产生许多新的克隆系;伤寒菌株的不断分化和新克隆系的产生,则又成为我国伤寒长期流行的重要原因。

有些地域性伤寒流行区,菌型复杂,多个克隆系菌株共存,没有明显的优势克隆系,致使这些地区伤寒长时间流行。

在分析不同来源伤寒菌株时我们还发现,一个地区的爆发菌株与另一地区的散发菌株同为一个克隆系内菌株。可见,某些地区伤寒的爆发或流行可能是由于新克隆系或亚克隆系菌株的产生或其他地区克隆菌株的传入所引起。而每次伤寒爆发或较大的流行中,或者一定时间内的某些地区,存在着一个主要的优势克隆系、优势亚克隆系,甚至一个优势的ET。我国伤寒沙门氏菌复杂的群体遗传结构和众多克隆系的存在,与伤寒大范围长年流行之间存在着互为因果的关系。

Molecular Epidemiological Characteristics of *Salmonella typhi* Strains Isolated in China I. Analysis of *Salmonella typhi* Strains Isolated in China by Multilocus Enzyme Electrophoresis Xu Wenbin, Qi Guoming, and Liu Yanqing. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

102206

Multilocus enzyme analysis by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to analyse 335 isolates of *S. typhi* from several provinces where high morbidity of typhoid fever was observed in recent years. We analysed 7 metabolic enzymes encoded by chromosome. The results showed that all the enzyme loci were polymorphic. The average alleles per locus was 7.4 (2-19); the mean genetic diversity per locus was 0.498 (0.198-0.883). There were 147 distinctive electrophoretic types (ETs) in 335 isolates. With cluster analysis by the average-linkage method, we found that there were 22 subclones, 12 clones among all isolates studied. Most isolates in 1988 from both Jiangsu and Zhejiang provinces belonged to one clone; the isolates from Guangxi Province in 1990 and parts of Hubei isolates belonged to one clone; the isolates from Hunan and Guizhou provinces during several-year period were homogeneous. However, the isolates from Xinjiang Autonomous Region were remarkably different from other provinces, belonging to a particular clone. We also observed that the isolates from an outbreak or epidemic were from a one subclone.

Key words *Salmonella typhi* Multilocus enzyme electrophoresis (MEE) Molecular epidemiology

参 考 文 献

- 1 Selander RK, Caugant DA, Ochman H, et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*, 1986, 51: 873.
- 2 Selander RK, Beltran P, Smith NH, et al. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect Immun*, 1990, 58: 2262.
- 3 小川和郎, 等主编. 酶组织细胞化学技术. 上海医科大学出版社, 1989.
- 4 马斌荣, 俞建明主编. 医学统计例解—SYSTAT软件包. 北京工业大学出版社, 1990.

(收稿: 1993-07-12 修回: 1993-08-07)