

我国伤寒沙门氏菌的分子流行病学特征

II. 部分伤寒沙门氏菌的16S rRNA 基因多态性

徐文斌¹ 祁国明² 刘延清¹

摘要 利用 PCR 扩增标记的 Dig-dUTP-16S rRNA 基因为探针, 分析我国不同时间和地区分离的119株伤寒沙门氏菌和1株鼠伤寒沙门氏菌染色体经 PstI 消化后的16S rRNA 基因限制性图谱。结果发现, 各菌株的杂交片段范围为7.0~26.5kb, 每个菌株有5~10条杂交带不等。通过对每个菌株的杂交结果进行数值分类, 119株伤寒沙门氏菌可分为38个 RTs, 其中新疆伊犁1991年流行菌株和大连1990年爆发菌株大部分 (13/20) 为同一 RT; 从国内各高发省份分离的一些流行株也有相同的 RT; 而一些地区的散发菌株具有独特的 RT; 鼠伤寒沙门氏菌的 RT 则更为特别。对39个 RTs 进行聚类分析发现: 国内的一些流行菌株, 爆发菌株在遗传距离0.55处聚成一大类; 而散发菌株, 非流行菌株则在0.70处聚成另一类。此外, 从健康带菌者分离的菌株251所具有的 RT 单成一类。鼠伤寒沙门氏菌的距离更远。

关键词 伤寒沙门氏菌 16S rRNA GRP 分子流行病学

Study on the Characteristics of Molecular Epidemiology for *Salmonella typhi* Isolated in China II. Analysis of 16S rRNA Gene Restriction Patterns (16S rRNA GRP) of *S. typhi* Isolated in China Xu Wen-bin, Qi Guo-ming, Liu Yan-qing. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

16S rRNA gene, a highly conservative gene in molecular evolution, was labeled with digoxigenin-11-dUTP by PCR. Using it as a probe, we investigated the 16S rRNA gene restriction patterns (16S rRNA GRP) of *S. typhi* after their chromosomes were digested with Pst I. Results show that the Pst I 16S rRNA GRP appears obvious polymorphism in strains of distinctive sources. The fragments containing 16S rRNA gene are sized 7.0-26.5kb in 16S rRNA GRP of Pst I. 119 strains can be divided into 38 ribotypes. Most of the strains causing outbreaks from Dalian in 1990 and strains isolated during the pandemic from Yili, Xinjiang in 1991 have the same ribotype; some ribotypes contain epidemic strains which are from different geographic areas; some strains from sporadic cases have their unique ribotypes. We also find the 16S rRNA GRP with Pst I of *S. typhimurium* rather different from that of *S. typhi*. Data from further analysis of Pst I ribotypes by mean-linkage clustering method show that pandemic strains, outbreak strains and epidemic strains cluster at 0.55 in genetic distance; nonepidemic strains and strains from sporadic cases gather to form another cluster at 0.70 in genetic distance. Ribotype of strain 251, which was isolated from an asymptomatic carrier is different from the two clusters. The ribotype of *S. typhimurium* is apparently far distant, comparing with that of *S. typhi*.

Key words *S. typhi* 16S rRNA GRP Molecular epidemiology

伤寒沙门氏菌的流行病学研究中, 传统的流行病学手段, 如噬菌体分型、血清学分型、生化指纹分型等, 在探明传播途径、追踪传染源方面发挥了重要的作用, 但这些方法研究的是细菌的表型, 其实验步骤繁琐, 有

许多难以控制的影响因素, 实验用试剂未能

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
102206 北京

2 中国预防医学科学院

本研究为国家自然科学基金资助课题。

标准化、商品化，以至试验结果难以稳定。现代分子生物学的发展给人们提供了更加简便、准确、实用的方法，如病原菌质粒谱和质粒酶切图谱分析 (plasmid profile analysis, PPA)^[1,2]；染色体酶切图谱，即染色体 DNA 限制性酶切片段长度多态性 (chromosomal restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的分析^[3,4]，探针杂交技术对分离菌株的鉴别与分型分析^[5,6]等。这些方法的广泛应用，使人们对传染病病原体的流行病学特征有了更深、更新的认识^[7,8]。

我们采用16S rRNA 基因多态性 (16S rRNA gene restriction patterns, 16S rRNA GRP) 分析方法，研究我国部分不同来源伤寒沙门氏菌的遗传背景和分子特征，以求能进一步探明我国不同时间和地区伤寒流行的内在联系。

材料与方法

一、菌株：实验选用不同地区、年代和流行方式中分离到的119株伤寒沙门氏菌，另有1株鼠伤寒沙门氏菌^[16]。

二、细菌染色体的提取：按常规方法操作。

三、染色体酶切及 Southern 转印：选用内切酶 BamHI、EcoRI、Hind III 和 Pst I 对提取的染色体进行消化，琼脂糖凝胶电泳分离，Southern 转膜和杂交后进行比较分析，从中选择 Pst I 作更进一步的16S rRNA GRP 分析。染色体的内切酶消化和 Southern 转膜按常规进行。

四、16S rRNA 基因探针的准备：通过对16S rRNA 基因序列的比较，从基因中的高保守区设计出一对引物，然后采用 PCR 扩增技术对伤寒沙门氏菌 Ty2的16S rRNA 基因进行 Dig 标记。

五、Southern 杂交：杂交按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 中说明书所述方法进行预杂交、杂交、洗膜、检测、保存。Dig 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。

六、结果的处理及数值分类：根据同一杂交膜上标准分子量，准确计算每个菌株杂交图谱中的每个杂交片段大小，然后把所有分析菌株所出现的不同大小的杂交片段由小到大排列。逐个分析每个菌株的杂交结果，如果杂交图谱(即16S rRNA GRP)中存在某一片段大小的杂交带，则记为1，反之，记为0或空格。这样，每个分析菌株的16S rRNA 杂交图谱都有一组自己的0、1数值排列，我们称之为此菌株的核糖核酸型 (Ribotype, RT)^[9]。不同来源菌株如果具有相同的数值排列则为同一个 RT。

七、结果的统计分析：以所有分析菌株出现的杂交片段由小到大排列作为分析变量，不同的 RT 为样本，采用平均连接法对样本进行聚类分析，得出不同 RTs 间的遗传关系树状图。

结 果

一、Pst I 16S rRNA 基因多态性：对119株伤寒沙门氏菌和1株鼠伤寒沙门氏菌的16S rRNA GRP 分析表明，不同来源的菌株在16S rRNA GRP 上有明显的多态表现(图1)。对120个菌株的16S rRNA GRP 分

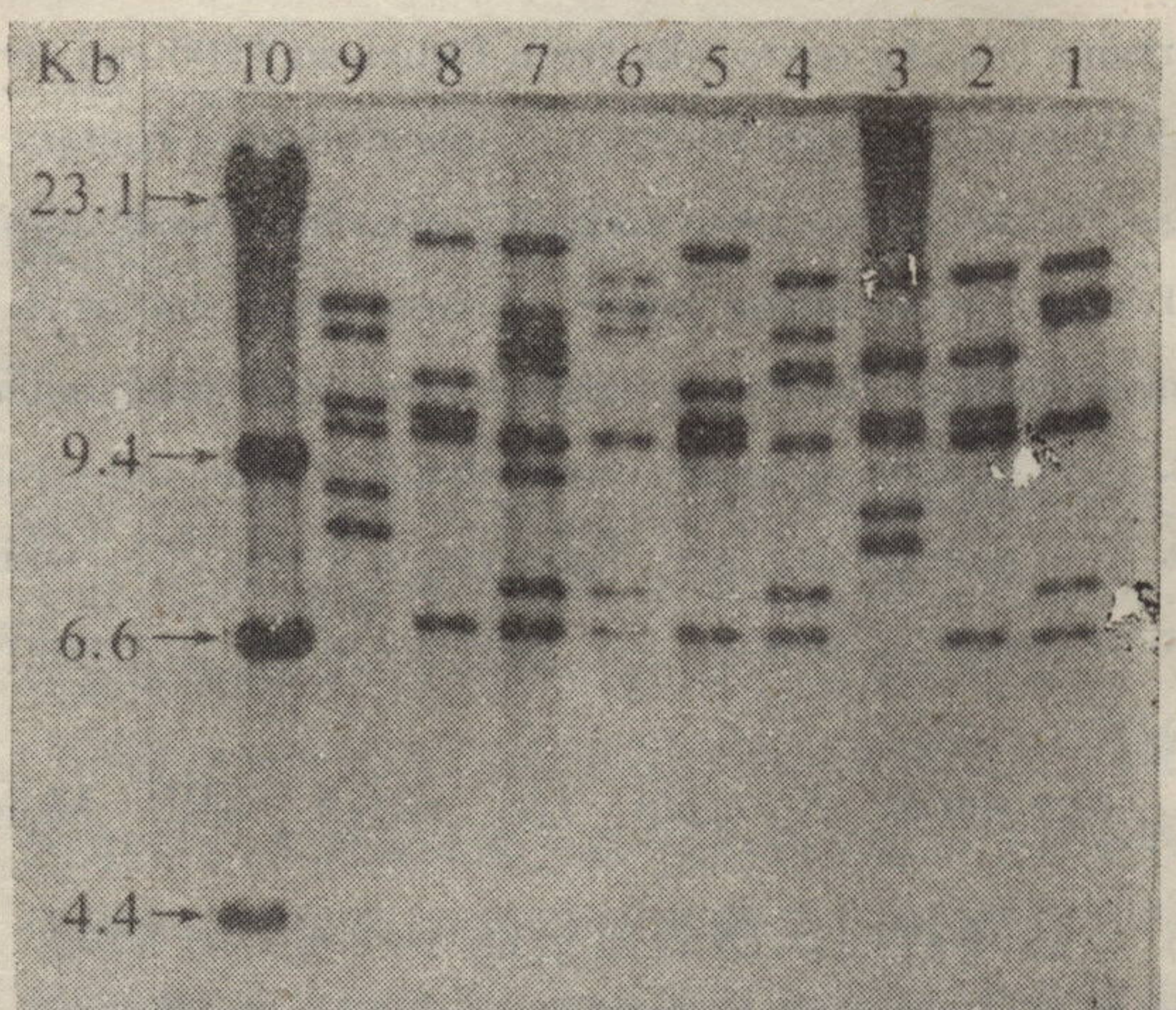


图1 部分菌株16S rRNA 基因多态性表现

1. 312, 2. 27, 3. 389, 4. 284, 5. 144, 6. 118, 7. 98, 8. 74, 9. 13, 10. Marker

析发现,一共有29条不同大小的杂交带出现,最小为7.0kb,最大的为26.5kb。119株伤寒沙门氏菌分属38个不同的RT,1株鼠伤寒沙门氏菌为一个单独的RT(图1,2),每个RT内有杂交带5~10条不等,绝大多数为5~7条。通过计算机对RT进行聚类,得出RTs间遗传关系树状图(图2)。

二、不同年代菌株RT分布情况:共分析1959、1981~1992年13个不同年份分离的部

分菌株。发现有些RT存在于不同年代的菌株中,如RT6、9、11;而有些RT只出现在某个年份分离的菌株中,如1981年的RT14,1986年的RT17、18、19,1987年的RT20、21、39,1988年的RT12、13、22,1989年的RT30,1990年的RT2、5、29,1991年的RT25、34、35。而且发现1959年菌株与近十几年分离的菌株有相同的RT(表1)。

表1 不同年代分离菌株的RT分布

分离年代	菌株数	RT数	RT*
1959	4	3	6 (1), 9 (2), 36 (1)
1981	4	3	4 (1), 9 (2), 14 (1)
1982	6	6	6 (1), 11 (1), 15 (1), 16 (1), 31 (1), 36 (1)
1983	2	2	6 (1), 26 (1)
1984	4	2	6 (2), 26 (2)
1985	3	3	10 (1), 27 (1), 37 (1)
1986	5	4	11 (2), 17 (1), 18 (1), 19 (1)
1987	5	4	11 (2), 20 (1), 21 (1), 39 (1)
1988	20	12	6 (2), 7 (1), 8 (2), 9 (1), 10 (2), 11 (6), 12 (1), 13 (1), 22 (1), 28 (1), 31 (1), 32 (1)
1989	4	4	11 (1), 28 (1), 30 (1), 33 (1)
1990	41	15	2 (1), 3 (3), 4 (5), 5 (1), 6 (6), 7 (5), 9 (7), 10 (3), 11 (3), 23 (1), 27 (1), 29 (1), 31 (1), 33 (1), 36 (2)
1991	18	10	6 (1), 9 (6), 10 (1), 11 (3), 23 (1), 24 (2), 25 (1), 34 (1), 35 (1), 37 (1)
1992	2	2	4 (1), 6 (1)
合计	118	37	37 (118)

* 括号内为菌株数

三、不同地区分离菌株的RT分布:对湖北等9个不同地区分离菌株的RT分析发现,不同地区存在着相同的RT,如除湖北、大连外,其它分析地区均存在着RT6,湖北、湖南、河北、新疆均有RT4菌株,大连、江苏、新疆、贵州等地菌株的RT9,新疆、江苏、湖

南、贵州均存在的RT11。有些RT,只在一些特定的地区出现,如湖南的RT32、33、34、35、39;湖北的RT2、5;浙江的RT12;江苏的RT13;新疆的RT14~22、24、25、27~30;贵州的RT37等。在广西、大连和河北的菌株未发现有其独特的RT(表2)。

表2 不同地区分离菌株的 RT 分布

地 区	菌株数	RT 数	RT*
湖 北	6	5	2 (1), 3 (1), 4 (2), 5 (1), 36 (1)
广 西	8	2	6 (3), 7 (5)
大 连	10	2	9 (7), 10 (3)
浙 江	4	4	6 (1), 7 (1), 10 (1), 12 (1)
江 苏	9	4	6 (1), 9 (1), 11 (6), 13 (1)
新 疆**	27	21	3 (2), 4 (1), 6 (4), 8 (1), 11 (1), 14 (1), 15 (1), 16 (1), 17 (1), 18 (1), 19 (1), 20 (1), 21 (1), 22 (1), 23 (1), 26 (1), 27 (2), 28 (2), 29 (1), 30 (1), 31 (1)
新 疆***	10	4	9 (6), 23 (1), 24 (2), 25 (1)
湖 南	16	10	4 (1), 6 (1), 10 (1), 11 (5), 31 (2), 32 (1), 33 (2), 34 (1), 35 (1), 39 (1)
贵 州	23	8	6 (3), 8 (1), 9 (4), 10 (2), 11 (6), 26 (2), 36 (3), 37 (2)
河 北	5	2	4 (3), 6 (2)

* 括号内为菌株数

** 新疆非1991年伊犁伤寒流行菌株

*** 新疆伊犁1991年流行菌株

四、不同流行方式分离菌株的 RT 分布：
从表3可以看出，爆发菌株集中在少数几个 RT 内，且大部分菌株 (13/20) 具有相同的 RT (RT9)；流行菌株则较爆发菌株分散，具有多个不同的 RT；散发菌株几乎是每个菌

株都有自己的 RT；16个菌株存在15个不同的 RT。同时，爆发菌株的 RT (RT9、10、24、25) 在其他流行方式的菌株中未能发现。另外，从健康带菌者分离出的菌株具有与其他菌株不同的 RT (RT29)。

表3 不同流行方式分离菌株的 RT 分布

流行方式	菌株数	RT 数	RT*
爆发菌株	20	5	9 (13), 10 (3), 23 (1), 24 (2), 25 (1)
流行菌株	16	10	3 (2), 4 (3), 6 (1), 11 (4), 23 (1), 27 (1), 31 (1), 33 (1), 34 (1), 35 (1)
散发菌株	16	15	4 (1), 6 (2), 8 (1), 11 (1), 14 (1), 15 (1), 16 (1), 17 (1), 18 (1), 19 (1), 20 (1), 21 (1), 22 (1), 32 (1), 33 (1)
健康带菌	1	1	29 (1)
合 计	53	26	26 (53)

* 括号内为菌株数

讨 论

一、16S rRNA 基因多态性分析:rRNA (核糖体 RNA, ribosomal RNA) 普遍存在于各种细胞内,是蛋白质合成不可缺少的工具,而 rRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA

的 DNA 序列,在进化学上,该基因是最为保守的基因^[10]。整个 rRNA 基因操纵子包括 5S、16S、23S 三个 rRNA 基因、几个 tRNA 基因和一些插入序列及侧翼序列。而其中又以 16S rRNA 基因最为保守,基因中的有些序列在长期的进化过程中非常稳定,始终不变。

rRNA 基因在细菌染色体上存在多个拷贝，如在大肠杆菌 K12 的基因组中便有 7 个 rRNA 转录单位。因此人们常用 rRNA 基因多态性 (rRNA GRP) 来研究不同物种之间的种系发生学。近几年来，人们又发现它在细菌的分类学和分子流行病学中有非常重要

的应用价值，现已被广泛应用于细菌的分子流行病学特征研究^[11~15]。

二、我国伤寒沙门氏菌的 16S rRNA GRP 特征：在分析 Pst I 16S rRNA GRP 时发现，每个菌株都有 5~10 条不等的杂交带，可以肯定，16S rRNA 基因在伤寒沙门氏菌

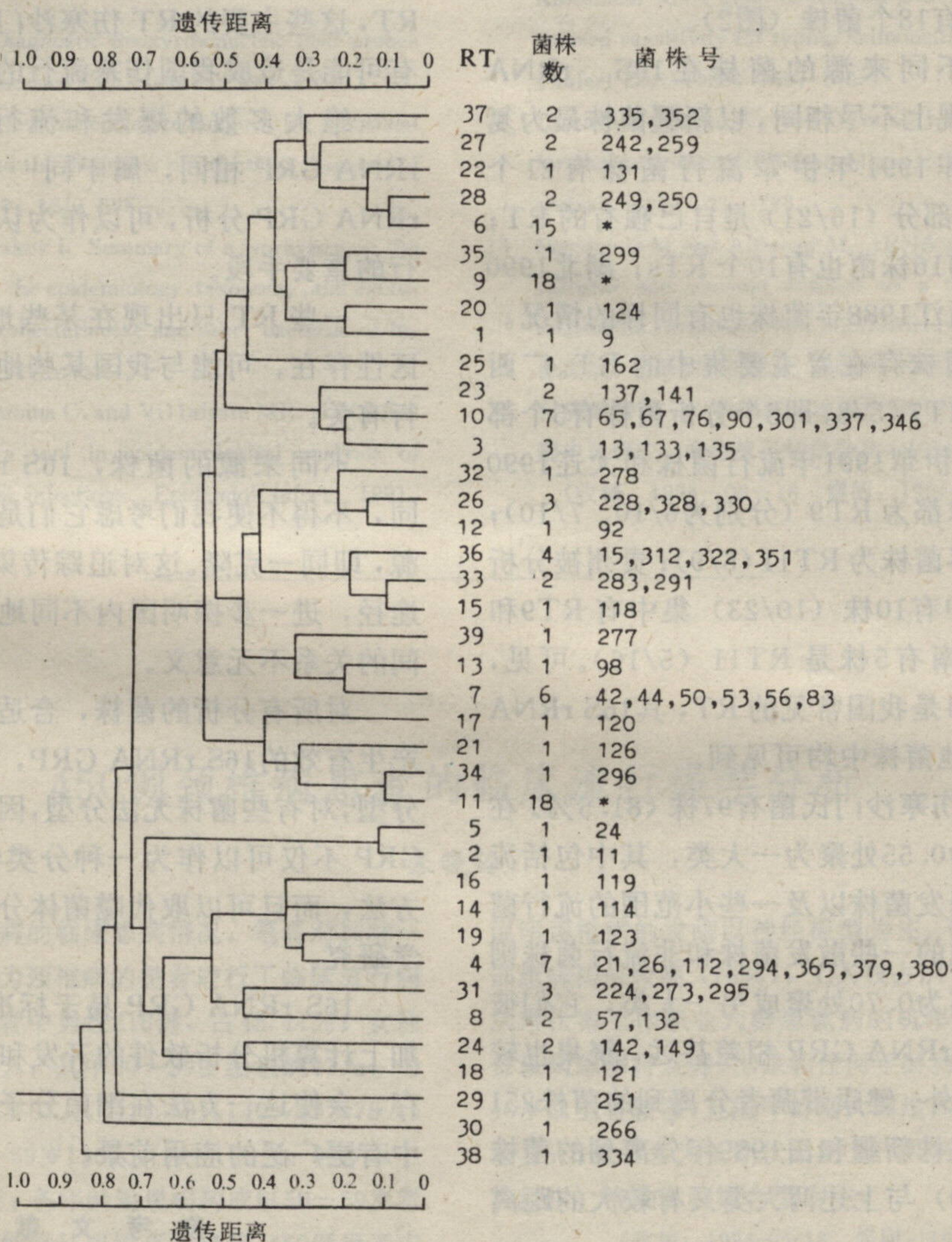


图2 RT 聚类树状图及所含菌株数和菌株号

- RT6: 27, 28, 35, 63, 88, 111, 138, 233, 236, 238, 302, 305, 326, 367, 378
- RT9: 64, 70, 72, 74, 78, 80, 82, 110, 140, 144, 161, 175, 209, 213, 309, 310, 316, 318
- RT11: 60, 93, 95, 100, 103, 106, 109, 116, 269, 270, 284, 290, 298, 340, 341, 348, 355, 360

染色体上存在着多拷贝。

在39个RTs中,除1株鼠伤寒沙门氏菌与伤寒沙门氏菌不属于同一血清变种而有独特的16S rRNA GRP外,还有21株伤寒沙门氏菌(21/119)有自己独特的16S rRNA GRP,另外98株伤寒沙门氏菌(98/119)的16S rRNA GRP分属于12个RTs中,有的RT包含多个来源不同的菌株,如RT9, RT11均含有18个菌株(图2)。

各地不同来源的菌株在16S rRNA GRP的表现上不尽相同,以新疆菌株最为复杂,27株非1991年伊犁流行菌株有21个RTs,且大部分(16/21)是自己独有的RT;其次湖南的16株菌也有10个RTs;湖北1990年菌株和浙江1988年菌株也有同样的情况。

各地菌株存在着主要集中的RT。广西1990年为RT7(5/8,即8个分析菌株有5个都是RT7);伊犁1991年流行菌株和大连1990年爆发菌株都为RT9(分别为6/10、7/10);江苏1988年菌株为RT11(6/9);贵州被分析的23株菌中有10株(10/23)集中有RT9和RT11;湖南有5株是RT11(5/16)。可见,RT9、RT11是我国常见的RT,其16S rRNA GRP在各地菌株中均可见到。

119株伤寒沙门氏菌有97株(81.5%)在遗传距离为0.55处聚为一大类,其中包括流行菌株,爆发菌株以及一些小范围的流行菌株;而各地的一些散发菌株和非流行菌株则在遗传距离为0.70处聚成另一大类,它们彼此间的16S rRNA GRP相差甚远,聚集也较为分散;另外,健康带菌者分离到的菌株251(RT29)和1株新疆和田1989年分离到的菌株266(RT30)与上述两大类又有较大的距离(图2)。

我们还发现,1959年的贵州菌株与近十几年来的菌株比较,在16S rRNA GRP上未见有何差异,没有自己独特的16S rRNA GRP,不仅与贵州本省的菌株有相同的16S rRNA GRP(RT36),而且与其他省份的菌株也有相同的16S rRNA GRP(RT6,RT9),同

样位于流行菌株聚类内,可见伤寒沙门氏菌在长期的分化过程中确实有较强的稳定性,这也提示我国各地不同时间伤寒流行、爆发流行可能有共同的来源。

三、16S rRNA GRP在流行病学上的应用:虽然各地伤寒菌株有一些特征性的16S rRNA GRP,但在不同的地区,总有一部分菌株具有相同的16S rRNA GRP,即主要的RT,这些主要的RT伤寒沙门氏菌的存在很有可能是造成我国伤寒流行的另一原因。

绝大多数的爆发和流行菌株,其16S rRNA GRP相同,属于同一RT,提示16S rRNA GRP分析,可以作为认定同一爆发流行的重要手段。

一些RT只出现在某些地区。相对的地区性存在,可能与我国某些地区伤寒长年流行有关。

不同来源的菌株,16S rRNA GRP相同,不得不使我们考虑它们是否来自同一起源,即同一克隆。这对追踪传染源,查明传播途径,进一步探明国内不同地区伤寒流行之间的关系不无意义。

对所有分析的菌株,合适的内切酶均能产生有效的16S rRNA GRP,不同于噬菌体分型,对有些菌株无法分型,因此,16S rRNA GRP不仅可以作为一种分类学手段和分型方法,而且可以取代噬菌体分型用于流行病学研究。

16S rRNA GRP易于标准化、数据化,加上计算机分析软件的开发和已有图谱的储存,会使这一方法在细菌分子流行病学研究中有更广泛的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Taylor DN, Wachsmuth IK, Shangkuan YH, et al. Salmonellosis associated with marijuana: a multistate outbreak traced by plasmid fingerprinting. *N Engl J Med*, 1982, 306: 1249.
- 2 Shlaes DM and Currie-McCumber CA. Plasmid analysis in molecular epidemiology: a summary and future directions. *Rev Infect Dis*, 1986, 8: 738.

- 3 Kaper JB, Bradford HB, Robert NC, and Falkow S. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the U. S. Gulf Coast. *J Clin Microbiol*, 1986, 16: 129.
- 4 Owen RJ. Chromosomal DNA fingerprinting—a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J Med Microbiol*, 1989, 30: 89.
- 5 Tompkins LS, Troup N, Labigne-Roussel A, and Cohen ML. Cloned, random chromosomal sequence as probes to identify *Salmonella* species. *J Infect Dis*, 1986, 154: 156.
- 6 Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 1988, 1: 82.
- 7 Esenstein BI. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis*, 1990, 161: 595.
- 8 Ørskov F and Ørskov I. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. *J Infect Dis*, 1983, 148: 346.
- 9 Nastasi A, Mammìna C, and Villafrate MR. rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of *Salmonella typhi* infections. *Epidemiol Infect*, 1991, 107: 565.
- 10 Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987, 51: 221.
- 11 Grimont F and Grimont PAD. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann Inst Pasteur/Microbiol*, 1986, 137B: 165.
- 12 Stull TL, Lipuma J, and Edlind T. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis*, 1988, 157: 280.
- 13 Altwegg M, Hickman-Brenner FW, and Farmer III JJ. Ribosomal RNA gene restriction patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella typhi* strains. *J Infect Dis*, 1989, 160: 145.
- 14 Esteban E, Snipes K, Hird D, et al. Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol*, 1993, 31: 233.
- 15 Martinetti M and Altwegg M. rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *salmonella enteritidis*. *Res Microbiol*, 1990, 141: 1151.
- 16 徐文斌, 祁国明, 刘延清. 我国伤寒沙门氏菌的分子流行病学特征. 1. 我国部分地区伤寒沙门氏菌的多位点酶电泳研究. *中华流行病学杂志*, 1994, 15(4): 218.
(收稿: 1994-08-18 修回: 1994-09-20)

450例颈椎病患者临床流行病学分析

张晓铃

为了解颈椎病的临床患病情况, 笔者对1988~1993年以来诊断为颈椎病的患者进行了临床流行病学分析。450例患者中男性218例, 占48.44%; 女性232例, 占51.56%; 其中20~29岁组患病47人, 为10.44%; 30~39岁67人, 为14.89%; 40~49岁78人, 为17.33%; 50~59岁196人, 为43.56%; 60岁以上62例, 为13.78%; 各年龄组患病构成以50~59岁者为高, 且有随年龄增长而增高的趋势。450例患者中神经根型257例, 占57.11%; 椎动脉型128例, 占28.44%; 混合型69例, 占15.33%; 其它仅占1.33%;

说明颈椎病的发病以神经根型为主。不同职业以干部患病构成较高(76%), 工人仅占24%; 提示长期从事伏案工作职业人群患该病的机率较高。本次调查该病患病特点为: ①该病任何年龄均可发生, 但以40岁以上者较多, 且随年龄增大而增高, 性别之间无差异; ②患者多为长期伏案的工作人员, 患病类型以神经根, 椎动脉和混合型为主。

(收稿: 1994-05-18 修回: 1994-09-20)

作者单位: 铁道部第一工程局西安医院 710054