

# 有关杨晓霞“怪病”病原菌的血清学调查

杨红梅 徐建国

**摘要** 山东小姑娘杨晓霞所患“怪病”，根据细菌学、血清学、药敏试验等研究结果，诊断为多细菌协同性坏疽。为了进一步探讨该病的最初病原菌及其来源，作者从患者家乡采集血清 18 人份，以从患者标本中分离的 4 种细菌的全菌蛋白为抗原，用 Western blot 方法进行了调查。结果显示：Y6 和 YP 菌株可能和患者生活环境有关，Y6 菌株有可能来源于池塘水中，作为最初病原菌的可能性最大；Y6 和 YP 菌株目前尚不能鉴定，对动物有毒力，有可能为新的病原菌。迟缓优杆菌、低酸链球菌和环境无关。

**关键词** 坏疽 蛋白免疫印迹试验

**Serological Investigation on Yang Xiao-xia's "Mysterious Disease"** Yang Hong - mei and Xu Jian - guo. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

**Abstract** The famous "mysterious disease" of Yang Xiao-xia, a girl from Shangdong Province, was diagnosed as multi-bacterial synergistic gangrene based on bacteriological, serological and antibiotics sensitivity findings. In order to uncover the initial pathogenic bacteria and to investigate their relationship with environment, a total number of 18 serum samples were collected from volunteers living around patient's home and from patient's relatives. Serological study on 4 bacterial strains isolated from patient, named as *Eubacterium lentum*, *Streptococcus acidominimus*, Y6 and Yp was conducted with Western blot, using whole cell protein preparation was carried out, and data obtained was statistically analysed. Our findings indicated that YP and Y6 strains were interrelated with environment of patient's home and Y6 from the pool where patient visited often and several hours before she initially experienced the disease. The strains of Y6 and YP are virulent to animals, indicating that they serve as potential pathogens. *Eubacterium lentum* and *Streptococcus acidominimus* are irrelevant to environment.

**Key words** Gangrene Western blot

山东小姑娘杨晓霞所患的“怪病”，因其症状奇特、久治不愈、病因不明，曾引起全社会的极大关注。徐建国等人从其深部组织中分离鉴定了 8 种细菌，分别为溶齿放线菌、迟缓优杆菌、消化链球菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、低酸链球菌，及尚不能鉴定的 YP 和 Y6 菌株<sup>[1]</sup>。根据细菌学、血清学和药敏试验的研究结果，将其诊断为多细菌协同性坏疽。鉴于 Y6 和 YP 菌株可能与环境有关，我们于 1995 年 8 月到患者家乡采集血清标本，对从

患者标本中分离的 4 株细菌进行了血清流行病学调查。现将结果报道如下。

## 材料和方法

一、菌种：迟缓优杆菌、低酸链球菌及尚不能鉴定的 YP 和 Y6 菌株。

二、血清收集：于 1995 年 8 月在患者家乡采集血清 18 份；患者及其父母血清分别于 1995 年 3 月、1995 年 5 月在北京军区总医院采集；另有 1994 年 1 月采集的本科室成员血清 8 人份。共计血清 29 人份。将所得血清按研究目的分为四组：

1. 密切接触组:共 5 人,生活环境相同,包括患者及其父母、祖父、弟弟。

2. 池塘组:共 12 人,均居住在患者家居地方圆百米之内,有用同一池塘水的历史。

3. 当地对照组:共 4 人,居住地与患者较远,未有用同一池塘水的历史。

4. 无关对照组:共 8 人,为本科室成员。

### 三、实验方法:

1. 细菌的培养和收集:Y6 和 YP 菌株用加 5% 脱纤维兔血的心脑浸液琼脂(BHIA)培养,生长至对数晚期,用 II 液洗下(II 液 Tris 10mmol/L, EDTA 5mmol/L,  $\beta$ -巯基乙醇 16 $\mu$ L/100ml, pH8.0),分装于 1.5ml 的 ependorf 管中;迟缓优杆菌、低酸链球菌用 BHI 肉汤培养至对数生长期,加入青霉素(100mg/ml),继续培养 6~9 小时后,离心收集菌体。

2. SDS-PAGE 电泳:用适量 II 液悬浮菌体,加入溶菌酶至终浓度为 10mg/ml, 37 $^{\circ}$ C 放置 1~2 小时,再加入 10% 的 SDS 至终浓度为 5%,使菌体全部裂解。上样前,加入等体积 2 $\times$  加样缓冲液,煮沸 10 分钟。然后按照 Laemmli 介绍的方法和条件<sup>[2]</sup>,进行全菌蛋白电泳,分离胶浓度为 12%,浓缩胶为 5%。

3. 蛋白免疫印迹实验(Western blot):按常规方法进行。

四、统计学分析:Western blot 实验结果表明,患者父母血清的反应带型和患者几乎一致,但是,其它收集血清的反应带型,与患者及其父母相差较大,故采用统计学方法进行资料的分析处理。我们以患者 Western blot 反应呈阳性的蛋白条带为基准,其他人每有一条反应带与患者相同,计数为 1,两条相同,计数为 2,以此类推,反应不同个体接触该菌可能性的大小。由于原始数据为半定量资料,不符合正态分布,故对结果进行秩和检验,比较四组人群接触这几种菌可能性的不同。

## 结 果

一、Western blot 反应结果:见表 1。

表 1 四组人群 Western blot 反应结果

血清	菌 株			
	YP	Y6	JQ*	Y5*
第 1 组:密切接触组				
患者	5	4	3	4
爷	1	0	2	3
父	2	3	3	4
母	5	4	3	4
弟	0	0	1	4
第 2 组:池塘组**	6(2)/9	6(1)/9	0/9	2(1)/9
第 3 组:当地对照组**	0/4	0/4	2/4	2/4
第四组:无关对照组**	2/8	0/8	0/8	2/8

\* JQ 和 Y5 分别代表迟缓优杆菌和低酸链球菌。JQ 和所有血清在 85KD、117KD 处均有反应条带;Y5 则在 110KD、174KD 处均有反应条带,但这 2 株菌的其它反应条带在四组人群中是不同的,故表 1 内,只统计了其它反应条带出现的情况。

\*\* 采用反应阳性数/检测人数的表示方法,括号内数字是出现两条带的人数。第 2、3、4 组血清的 Western blot 反应最多有两条反应带出现。

二、秩和检验结果:见表 2。设  $P < 0.1$  时差别显著。由于 Y6 和 YP 菌株第 3、第 4 组反应条带数均为零,显然没有差别,合并为一组,在表中显示为第 3 组。

表 2 各组间秩和检验结果

组一	各组间秩和检验的 P 值			
	Y6	YP	JQ	Y5
1~2	0.2463	0.1400	0.0275*	0.0052**
1~3	0.0578*	0.0500**	0.0016*	0.0251**
1~4	0.0400**	0.0062**	0.0043**	0.0043**
2~3	0.0153**	0.0523*	0.1456	0.3960
2~4		0.0896*	0.1742	0.8470
3~4		0.4969	0.2008	0.3082
整体	0.0228**	0.0335**	0.0038**	0.0125**

\*  $P < 0.1$ ; \*\*  $P < 0.05$ , 差别有显著性。

Y6 和 YP 菌 1、2 组间,3、4 组均无显著性差别( $P > 0.1$ ),分别合并,再行秩和检验, P 值均为 0.0079,有显著性差别。

JQ 和 Y5 菌株 2、3、4 组间均无显著差

别( $P > 0.1$ ), 合并后和第一组比较,  $P$  值分别为 0.0135、0.0321,  $P$  值均  $< 0.1$ , 有显著差别。

## 讨 论

为了探讨杨晓霞“怪病”可能的最初病原菌, 及感染菌株与环境的关系, 我们综合细菌学资料, 选择 Y6、YP、迟缓优杆菌、低酸链球菌进行了血清学研究。

迟缓优杆菌虽是人体正常菌群之一, 但常可从伤口感染灶中分离到<sup>[3]</sup>, 该菌与患者血清不发生试管凝集, 但蛋白免疫印迹试验却表现出一条强的反应蛋白带。有关迟缓优杆菌的资料较少, 存在毒力菌株的可能性不能排除。血清学研究结果显示: 所有血清和迟缓优杆菌均出现了 85KD、117KD 反应条带, 说明该菌在人群中的感染率很高, 可能为异位感染所致, 但对于 29KD、39KD、59KD 反应带的出现, 四组人群有显著差别( $P < 0.1$ )。2、3、4 组间无显著性差别( $P > 0.1$ ), 第 1 组和其余三组差别显著( $P < 0.1$ ), 29KD 集中出现在密切接触组中。结果提示: 患者所感染菌株和一般的迟缓优杆菌可能并不相同, 很可能此菌是由于异位感染而参与了此病的发展, 因家庭成员密切接触患者, 感染该菌, 产生了抗体。该菌的感染不大可能和环境有关。

低酸链球菌多从牛的阴道、皮肤和牛奶中分离到, 从临床分离到的资料甚少。但该菌刺激患者产生高滴度的抗体(1:1 280), 说明和该病不无关系。Western blot 结果表明: 所有的血清在 110KD、174KD 处均有两条反应带, 考虑该菌的存在部位, 可能并不代表人群中的感染情况, 而是一种特异的交叉反应。故这两条反应带不予考虑, 仅将 37KD、59KD 蛋白条带进行统计分析, 发现 2、3、4 组间无显著性差别( $P > 0.1$ ), 而第 1 组和其余三组差别显著( $P < 0.1$ )。说明家庭成员接触该菌的可能性较其余人群高。在调查中我们发现, 患者家中恰有一头母牛。综合这

些情况, 有可能该菌来源于杨家小环境中, 血清学结果也不排除由于密切接触, 感染该菌的可能。

Y6 菌和 YP 菌株的血清学结果相同, 1、2 组之间, 3、4 组之间无显著性差别( $P < 0.1$ ), 合并后比较差别有显著性( $P < 0.1$ )。说明杨家方圆百米之内, 共用一池塘水的人群中, 接触这 2 株菌的可能性较别的人群高, 而和密切接触无关(1、2 组之间无差别)。Y6 菌株在 37℃ 不生长、30℃ 生长良好, 符合某些水源性细菌的特性。患者病历中记载, 发病前曾发现右手中指一米粒大黑色病变, 疑为扎入的刺, 用针挑破后, 又在水塘里洗衣, 当晚发病。YP 菌在有氧条件下产生芽胞, 产芽胞菌的生命力一般较强, 与环境有关的因素不能排除。结合病人发病情况和 Y6、YP 菌株的细菌学特点, 我们认为: Y6 菌株有可能来源于池塘水中, 而 YP 菌可能存在于患者生活的当地环境中。最初的病原菌可能是 YP 和 Y6 菌株, 它们通过机械方式进入机体(手指破损), 引发感染。其中 Y6 菌株具有水源性细菌的特点, 作为最初病原菌的可能性最大。更重要的是, YP 和 Y6 菌株目前尚无鉴定, 它们对动物有毒力, 有可能是新的病原菌。

鉴于国内外尚无对多细菌协同性坏疽进行血清流行病学调查的报道, 我们的研究结果对进一步阐明该类疾病的病因学具有重要意义。

(衷心感谢中国预防医科院流研所微生物室吴纪民、黄力保、赖心河、邓庆东, 及北京军区总医院武仰晶等同志在标本采集过程中做出的努力, 感谢山东省德州市、临邑县领导和防疫站对我们工作的支持)

## 参 考 文 献

- 1 徐建国, 赖心河, 付晓丽, 等. 一例罕见的多种细菌协同性坏疽的病原学研究. 中国疾病监测, 1995, 10(10): 300.
- 2 Laemmli VK. Cleavage of structure protein during the assemble of the heade of bacteriophage T4. Nature, 1970, 22: 680.

- 3 Brook I, Frazier EH. Significant recovery of nonsporulating anaerobic rods from clinical specimens. Clin Infect Dis, 1993, 16:476. (收稿:1996-06-03 修回:1996-08-15)

## · 书 讯 ·

### 《崔君兆论文集》出版在即

崔君兆, 1948年毕业于白求恩医科大学, 1958~1960年在北京外国语学院学习外语, 1960~1962年在莫斯科原苏联医学科学院格氏流行病学及微生物学研究所自然疫源疾病科进修, 1975~1977年在广西第五期西医学习中医班结业, 1983~1984年在加拿大渥太华大学医学院进修流行病学。现任广西壮族自治区卫生防疫站主任医师, 中国名医疑难病研究所研究员, 四川侨光医药保健科学研究所研究员, 国际流行病学协会会员, 中华医学会及中华预防医学会理事, 广西流行病学学会名誉主任, 广西中西医结合研究会常委, 广西留学生联谊会理事, 美中医学协会会员, 中国微生物学学会永久会员, 广西科普作家协会会员, 《中国公共卫生学报》及《中国公共卫生》杂志编委, 《广西医学》编委。从事过临床医师、主治医师、教学助教讲师及防疫科研工作多年, 擅长流行病学及弓形体病诊治等。共获 12 项科技进步成果奖, 例如他主持《家犬免疫法控制狂犬病研究》1978年获广西科技大会奖, 《广西人畜弓形体病研究》1987年获广西科技进步三等奖及 1988年卫生部科技进步三等奖, 《中国人畜弓形体病调查研究》获 1990年广西科技进步二等奖及广西医药卫生科技进步一等奖, 《登革热监测和单克隆抗体细胞株建立和应用》获广西科技进步二等奖及广西医药卫生科技进步二等奖。曾主编、合编、翻译、审校正式出版著作 12 部, 内部著作 8 部, 合计著作 20 部, 代表性著作有《弓形体病》、《人类弓形体病》、《流行病学》、《人类传染病的管理》、《中国登革热》、《中国人畜狂犬病》、《艾滋病人的管理》、《流行性感冒》等。曾发表学术论文 180 篇, 其中有 10 篇在国际刊物发表, 有 25 篇获省、市优秀科技论文奖。1983年获国家少数民族地区从事科技工作荣誉证书, 1986年获卫生部从事卫生防疫工作三十年荣誉证书, 1992年获广西教委优秀回国留学人员荣誉证书, 1986年 11 月 16 日《健康报》以《植根壮乡硕果累累》文章及 1993年 10 月 15 日以《愿龙的传人聪明伶俐——记弓形体病专家崔君兆》文章和 1992 年第 3 期《医学与哲学》杂志以《数十余年磨一剑, 壮士大器告晚成》文章分别介绍报道过崔君兆同志的事迹, 颇受群众欢迎。崔君兆同志的事迹曾分别被以下刊物辞典等书刊入录:《广西自然科学学会英华录》(1988年广西科学技术协会)、《广西科技英才》、《当代华佗》(1991年科技日报社)、《中华医学病毒学名人录》(1993年中国科技出版社)、《中国科技工作者名录》(1990年中国国际广播出版社)、《中国当代医学家荟萃》(第六卷, 1994年吉林科技出版社)、《中国高级医师咨询辞典》(1993年知识出版社)、《中国当代高级医师大全》、《中国当代名医良药实用辞典》、《中国英才》、《中国实用科技成果大辞典》、《中国科技人才大辞典》、《中国当代高级科技人才系列词典》、《当代医药界英才》、《求医部实用辞典》、《中国实用科技成果大辞典》、《当代中国科学家与发明家辞典》、《中国大陆名医大典》、《走向世界的中华医药事业》等。1993年获中华人民共和国国务院颁发的为发展我国医疗卫生事业做出突出贡献、享受政府特殊津贴及证书, 被收录 1994 年第 24 卷 Dictionary of International Biography《国际名人传记辞典》, 1994 年获卫生部边远地区优秀医学科技工作者奖, 1995 年被中加肿瘤生物协作中心北京的《疑难杂病特色医疗人才库》入录, 荣获《疑难病特色医疗人才》称号。1995 年英国剑桥国际名人传记中心的《杰出服务成就者, Men of Achievement》第 17 版等也入录。

为了汇总、学习、研讨崔君兆 40 多年来取得的研究成就, 我部受广西壮族自治区人民政府的委托, 编辑了《崔君兆论文集》。该论文集精选收录了 40 余年公开发表的 105 篇论文, 限于篇幅, 部分论文只作为列题, 以供查阅, 全书以弓形体、登革热、狂犬病和流感为主, 集中展现了崔君兆主任医师在这些领域的主要研究成果, 是一部有较高学术价值的文献和专业史料。全书共计 80 余万字, 拟于 1997 年上半年出版, 全书定价 60.00 元, 欲订此书, 请与中华流行病学杂志编辑部联系。