

中国七日热型、澳洲型钩端螺旋体分子流行病学调查

时曼华 梁中兴 杜雪飞 蒋秀高 聂一新

【摘要】 目的 确定耕牛是否为七日热型、澳洲型钩端螺旋体病的传染源。方法 自钩端螺旋体病患者血液及耕牛尿中分离出的 12 株七日热型、澳洲型钩端螺旋体野生株染色体 DNA 用限制性内切酶 *EcoR* I 酶切后,进行染色体 DNA 限制性内切酶图谱及 16S+23S rRNA 基因限制性内切酶片段长度多态性分析。结果 自钩端螺旋体病患者血液及耕牛尿中分离的同一血清型的钩端螺旋体野生株的染色体 DNA 酶谱及核糖核酸型相同。血清型不同的钩端螺旋体野生株的染色体 DNA 酶谱及核糖核酸型则不相同。结论 耕牛是我国七日热型及澳洲型钩端螺旋体病的传染源,这对控制我国七日热型及澳洲型钩端螺旋体病的流行有着非常重要的现实意义。

【关键词】 钩端螺旋体病;传染源;染色体;核糖体核糖核酸基因

A molecular epidemiological investigation on *Leptospira interrogans* serovar hebdomadis and australia in China SHI Manhua*, LIANG Zhongxing, DU Xuefei, et al. * Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective In order to confirm whether cattle serve the source of infection for patients with *Leptospira interrogans* serovar hebdomadis and australia. **Methods** 12 field strains of *Leptospira interrogans* serovar hebdomadis and australia were isolated from blood samples of patients with leptospirosis and farm cattle urine. An analysis of chromosome DNA restriction endonuclease patterns (REP) and restriction fragments length polymorphism (RFLP) of 16S+23S rRNA gene were processed by digestion of chromosome DNA using *EcoR* I. **Results** The same serovar field strains of *Leptospira interrogans* from blood samples of patients with leptospirosis and farm cattle urine resulted in unique restriction endonuclease patterns (REP) and ribosomal types (RT). The chromosome DNAs from field strains that belonged to different serovars of *Leptospira interrogans* caused different restriction endonuclease patterns and ribosomal types. **Conclusion** In accordance with this results, we recognize that farm cattle serve the infectious source of leptospirosis serovar hebdomadis and australia thus may have realistic significance in the control of leptospirosis serovar epidemic of hebdomadis and australia in China.

【Key words】 Leptospirosis; Source of infection; Chromosome; rRNA gene

钩端螺旋体(简称钩体)病是一种流行范围十分广泛的自然疫源性疾病。目前为止,我国已发现的钩体宿主动物(传染源)有 67 种之多^[1]。哪种动物是我国两大流行菌群七日热和澳洲型钩体的主要宿主,这是我国钩体病专家几十年来一直希望解决的问题。我们应用聚合酶链反应(PCR)和钩体培养法检测了近千份钩体病患者血液、牛肾组织和牛尿标本,认为耕牛是我国钩体病的主要传染源^[2-4]。对自钩体病人和耕牛分离出的钩体的血清学鉴定结果初步表明^[3]耕牛是我国七日热及澳洲型钩体病的

传染源。笔者应用染色体 DNA 限制性内切酶分析(REA)及 16S+23S rRNA 基因限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)分析技术,对自钩体病患者血液及耕牛尿液分离出的 12 株七日热型、澳洲型钩体野生株染色体 DNA 进行分析,现将结果报告如下。

材料与方法

1. 菌株:实验用钩体七日热型(56601)和澳洲型(56607)中国参考株由中国药品生物制品检定所提供,野生株亦承蒙该所鉴定(表 1、2)。上述菌株均在 8%兔血清磷酸盐培养基中 28℃培养 7~10 d。
2. 钩体染色体 DNA 的提取及纯化:参照 Marshal 等^[5]的方法,稍作改进。

作者单位:102206 北京,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所钩端螺旋体病研究室(时曼华、梁中兴、蒋秀高、聂一新)南京市卫生防疫站(杜雪飞)

3. 染色体 DNA 酶切图谱的制备:用限制性内切酶 EcoR I 消化钩体染色体 DNA, 2~3 μ g DNA 加 5~10 U 的限制性内切酶,总反应体积 20~30 μ l,置 37 $^{\circ}$ C 水浴中 3 h。分子量参照物为 λ DNA/HindIII。电泳完毕后,将胶置于 254 nm 紫外光下透射观察并照相。

表1 七日热型钩体野生株分离地点、时间及来源

菌株编号	分离地点	分离时间(年)	菌株来源	血清群	血清型
5JC098	江西上高	1995	耕牛尿	七日热	七日热
5JC148	江西上高	1995	耕牛尿	七日热	七日热
5JC199	江西上高	1995	耕牛尿	七日热	七日热
4JH005	江西上高	1994	病人血	七日热	七日热
4JH043	江西上高	1994	病人血	七日热	七日热
5JH202	江西上高	1995	病人血	七日热	七日热

表2 澳洲型钩体野生株分离地点、时间及来源

菌株编号	分离地点	分离时间(年)	菌株来源	血清群	血清型
5JC029	江西上高	1995	耕牛尿	澳洲	澳洲
5JC033	江西上高	1995	耕牛尿	澳洲	澳洲
5JC057	江西上高	1995	耕牛尿	澳洲	澳洲
4JH016	江西上高	1994	病人血	澳洲	澳洲
5JH072	江西上高	1995	病人血	澳洲	澳洲
4JH092	江西上高	1994	病人血	澳洲	澳洲

4. Southern 转印 按常规方法转膜 16 h。

5. 引物设计及探针的制备:根据钩体 *Canicola* Multon 株的 16S rRNA 和 23S rRNA 基因,选择保守区设计两对引物:

16S 5'¹⁸-CCTGGCTCAGAACTAACG-3'
 5'¹²⁸¹-AGACTCCAATCCGTAAGTGG-3'
 23S 5'²²⁰-GTCAGTAGCGGTGAGCGAA-3'
 5'¹⁴³²-ACCTGCTTCCCATCGACTAC-3'

以 *E. coli* DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增片段长度为 1.2 kb 和 1.4 kb,用 Dig-dUTP 对这两个片段进行标记。

6. 预杂交、杂交及免疫学检测 均参照地高辛试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司)说明。

结 果

1. 七日热型、澳洲型钩体野生株及相应的参考株染色体 DNA EcoR I 酶切图谱酶切结果显示:自钩体病患者血液和耕牛尿分离出的七日热型钩体野生株(各 3 株)染色体 DNA 酶谱完全相同,与相应的参考株(56610)染色体 DNA 酶谱相比,两者在

23.1~9.4 kb 这一高分子区段的 4 条带大小不一致。澳洲型钩体野生株(各 3 株)及相应的参考株(56607)染色体 DNA 酶谱完全相同。七日热、澳洲型两型钩体野生株的染色体 DNA 酶谱则完全不同,七日热型参考株与澳洲型参考株的染色体 DNA 酶谱也不相同。

2. 16S+23S rRNA 基因限制性内切酶 EcoRI 酶片段长度多态性分析:自钩体病患者血液和耕牛尿分离出的七日热型钩体野生株(各 3 株)的核糖核酸型相同,4 条杂交带排列一致(8、5、2、1 kb),但与其参考株(56610)的核糖核酸型有差别,表现在小分子区段(<2.3 kb)有一条带的排列不同。澳洲型钩体野生株之间及其相应的参考株之间的核糖核酸型则完全相同,表现为 6 条杂交带的分布一致(23、10、8、5、2.7、1 kb)。

讨 论

钩体菌型复杂,单致病性钩体就有 23 个血清群 255 个血清型。钩体菌株,即使是在实验室传代的参考株,受生存的自然和宿主环境的变化压力,也容易发生变异。因此,用仅反映菌株表型变化的传统交叉吸收显微凝集试验对钩体菌进行鉴定,就给临床治疗及流行病学调查带来不便。

自 Marshal 等^[5]1981 年首次将 REA 用于钩体以来,REA 已被广泛应用于钩体和钩体病的研究,并证明对钩体病的流行病学调查有一定的价值^[6,7]。REA 所揭示的不同血清群、型钩体,甚至是不同株之间的遗传差异与流行病学更为接近^[8]。在 REA 基础上发展的 rRNA 基因 RFLP 法,则以 rRNA 基因为探针,通过分析染色体酶切片段的长度多态性对钩体进行基因分型,具有灵敏、较 REA 带型少、结果容易判断等优点。

我们应用 REA 及 16S+23S rRNA 基因 RFLP 技术对上述菌株的分析结果表明:不同时期从不同宿主(钩体病人、耕牛)分离的血清型相同的钩体野生株染色体 DNA(七日热型、澳洲型)酶谱及核糖核酸型均相同,血清型不同的钩体野生株染色体 DNA(七日热型、澳洲型)酶谱及核糖核酸型则不相同,与国内外的报道一致^[9,10]。

根据上述结果,我们认为,耕牛是我国七日热型及澳洲型钩体病的传染源,这对于控制我国长江流域及其以南省区的钩体病流行具有重要的现实意义。

另外,本实验中我们发现 6 株澳洲型钩体野生株与相应的参考株之间的染色体 DNA 酶谱及核糖核酸型完全相同。而 6 株七日热型钩体野生株与相应参考株的染色体 DNA 酶谱在高分子区段显示出差别。核糖核酸型则在低分子区有一条杂交带排列不一致。这说明表型上一致的钩体,其遗传背景不一定相同。我们认为,七日热型钩体野生株与其参考株表现出的差异,可能系钩体适应不同宿主体内环境的差异而产生的,但也不排除它们可能为七日热型钩体的一个新亚型,这有待于进一步证实。

参 考 文 献

- 1 时曼华,于恩庶,屠云人,等. 我国钩端螺旋体病地理流行病学研究. 中华流行病学杂志,1995,16:259-262.
- 2 梁中兴,时曼华. 应用免疫金银染色及相差显微镜检测牛尿中钩体 DNA. 中国人兽共患病杂志,1997,13:25-27.
- 3 梁中兴,龙健,秦进才,等. 江西上高钩端螺旋体病主要传染源(耕牛)和主要流行菌群(七日热群)研究. 中国人兽共患病杂志,1997,13:13-15.
- 4 时曼华,梁中兴,Terpstra WJ,等. 我国耕牛钩端螺旋体带菌和

排菌状况调查. 中华流行病学杂志,1997,18:12-14.

- 5 Marshal RB, Wilton BE, Robinson AJ, et al. Identification of leptospira serovars by restriction endonucleases analysis. J Med Microbiol,1981,14:163-166.
- 6 Robinson AJ, Ramadass P, Lee A, et al. Differentiation of subtypes within Leptospira interrogans serovars hardjo, balcanica and tarassovi by bacterial restriction endonuclease DNA analysis (BRENDA). J Med Microbiol, 1982, 15:331-338.
- 7 Marshal RB. International committee on systematic bacteriology. Subcommittee on the taxonomy of Leptospira. Minutes of the meeting, 13 and 15 Sept, 1990, Osaka, Japan Int J Syst Bact, 1992, 42:330-337.
- 8 Le Febvre RB, Thiermann AB. DNA homology studies of leptospire of serogroup Sejroe and Pomona from cattle and swine. Am J Vet Res, 1986, 47:959-963.
- 9 Ellis WA, Montgomery JM, Thiermana AB. Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in study on pig isolates belonging to Australis serogroup of Leptospira interrogans. J Clin Microbiol, 1991, 29:957-961.
- 10 梁中兴,时曼华. 钩端螺旋体 DNA 限制性内切酶图谱分析. 中国人兽共患病杂志,1993,9:13-15.