

中国鼠疫菌核糖体型地理分布

魏建春 俞东征 海荣

【摘要】 目的 了解鼠疫菌核糖体型在中国的地理分布情况。方法 用限制性内切酶对鼠疫菌染色体进行消化,电泳后,用 16s-23s-5s rRNA 基因探针进行 Southern 杂交。结果 把分离自中国不同地区的鼠疫菌共分成了三个核糖体型,每种类型的杂交图谱大概一致,区别仅在于 1~2 个酶切片段的有无。核糖体 A 型及 B 型较常见,分布于中国较大范围的地理区域内,C 型最少,只见于某一特殊地区,核糖体型与中国鼠疫自然疫源地之间有一定的对应关系,一种疫源地对应一种核糖体型常见。结论 核糖体型在中国鼠疫自然疫源地内比较稳定,不同核糖体型在中国的分布具有明显的地域性;A、B、C 三种核糖体型具有不同的来源,而 A 型与 C 型的亲缘关系更近。

【关键词】 鼠疫菌;核糖型;自然疫源地

The geographical distribution of ribotypes of *Yersinia pestis* in China WEI Jian-chun, YU Dong-zheng, HAI Rong. Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To type and group the *Yersinia pestis* strains isolated in China to clarify the geographical distribution of ribotypes of *Yersinia pestis*. **Methods** Genomic DNA of *Yersinia pestis* were digested with EcoR I, then hybridized with 16s-23s-5s rRNA gene probe. **Results** These tested strains were divided into 3 ribotypes, the profiles obtained were relatively homogeneous, with most of them differed only by the presence or the absence of 1-2 restriction fragments. Ribotype A and B were the most common types which distributed in a large area in China while ribotype C was the least, only limited to a small area. There was certain correlation between the ribotypes and the plague foci, usually only one ribotype was found in one plague foci. **Conclusion** The ribotypes were stable in the plague foci. Correlation between the ribotypes of *Yersinia pestis* strains and their geographical origins was noticed. All 3 ribotypes had different origins, however ribotype A and ribotype C seemed to be closer related.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Ribotype; Natural foci

鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)是一种相对来说比较保守的细菌,只有一种血清型、一种噬菌体型和三种生物型。目前,基因分型方法在许多病原体中得到了广泛的发展和应用,鼠疫菌在这方面的研究也已广泛开展。核糖体分型方法即是其中之一^[1-5]。本项研究选用杜邦公司的 Riboprinter Microbial Characterization System 对分离自中国不同疫源地的鼠疫菌进行了研究。

材料与方法

1. 菌株来源:由国家菌库青海鼠疫菌种保存中心提供,所有菌株均根据其致病特征和噬菌体裂解试验确定为鼠疫耶尔森菌。菌株分离自我国 10 个鼠疫自然疫源地,分属于 17 个不同的生态型。

2. 染色体 DNA 的提取:鼠疫菌接种于赫氏琼脂斜面,培养 48 h,收获细菌,生理盐水洗 2 次,加裂解液(1% SDS, 0.6 mg/ml 蛋白酶 K, 12 μg/ml RNase)作用 2~3 h,用酚、酚-氯仿、氯仿抽提,TE 透析 24 h, -20℃ 保存。

3. 主要设备:Riboprinter Microbial Characterization System。

4. 试剂:限制性内切酶 EcoR I、rRNA 基因探针等由杜邦公司提供,提取染色体的常规试剂由华美公司提供。

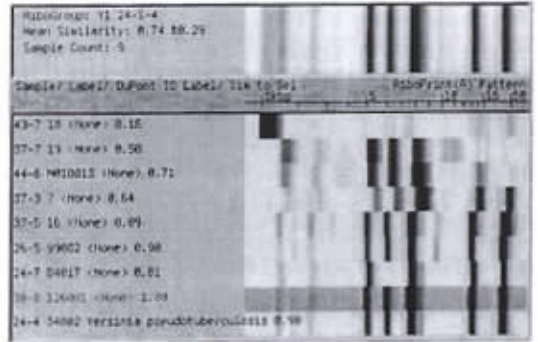
5. 主要步骤:染色体 DNA 提取以后,使用 Riboprinter Microbial Characterization System 进行 DNA 样本的处理与分析,使用限制性内切酶 EcoR I、16s-23s-5s rRNA 基因探针。

结 果

鼠疫菌染色体 DNA 经限制性内切酶 EcoR I

消化、电泳后, rRNA 基因探针的杂交图谱表明, 有 6~9 条清晰可见的酶切片段可被 rRNA 基因探针识别, 按主要杂交带得到 8 种不同的图形, 有 5 种图谱每种都只在 1 株菌中发现, 其余 83 株菌分属 3 个不同的类型, 三种类型图谱的大致轮廓一致, 区别仅在于缺少或存在 1~2 个酶切片段 (图 1)。研究结果把所试菌株划分为 3 型 (A、B、C 型), 其中具有 30、13、7.8、5.1、2.4、1.5 kb 6 个酶切片段的菌株, 将其称为 B 型, 多出 6.1 和 1.9 kb 2 条片段的称为 A 型, 多 3 条 6.1、1.9、9.6 kb 酶切片段的为 C 型。A 型最常见 (44/88), B 型次之 (35/88), C 型最少, 只局限于某一地区 (4/88), 另外 5 株因所得图形特殊, 且分别只有 1 株, 故未进行分类。鼠疫菌核糖体型在中国的分布情况见图 2, 可以看出鼠疫菌核糖体型的分布具有明显地域性, 在一定地区内, 基本上是以一种核糖体型为主; A 型和 B 型分布广泛, 存在于我国的广大地区内。核糖体型与我国鼠疫自然疫源地之

间有一定的对应关系, 具体情况详见表 1。



34002 和 126001 为核糖型 A; 84017 为核糖型 B; 99082 为核糖型 C; 其他图形包括 16、7、N010013、19、18

图1 中国不同疫源地分离的鼠疫菌 EcoR I 酶切后的核糖体型

讨 论

国内外学者曾对鼠疫菌的分型进行了广泛的研究, 在我国广泛应用的是纪树立等人在 20 世纪 80 年代初建立的生态分型系统, 他们根据多种生化特

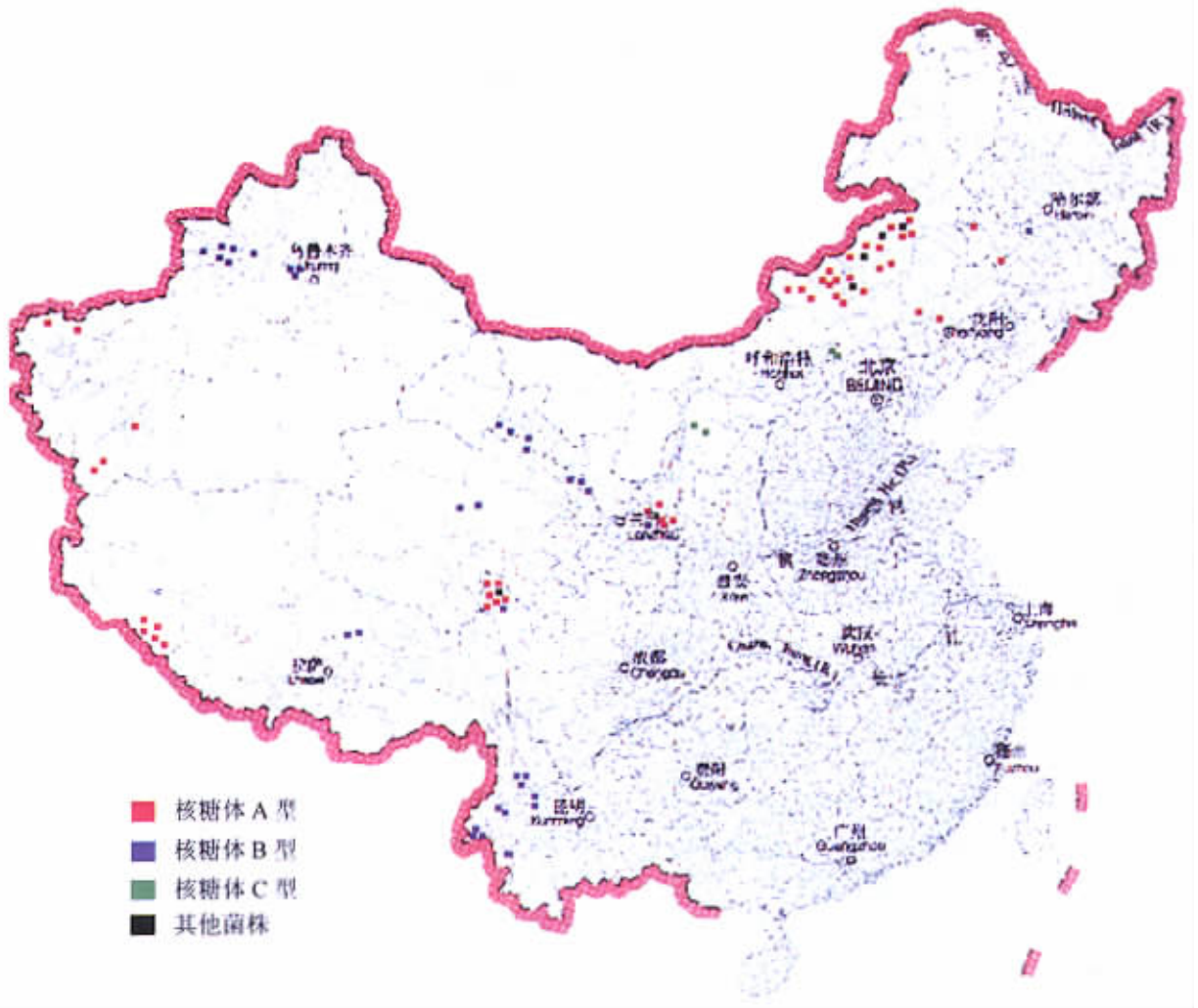


图2 中国鼠疫菌核糖体型地理分布

表1 中国鼠疫疫源地与核糖体型的对应关系

疫源地类型	分布地区	核糖 体型
I 青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地	青海、甘肃、西藏、新疆、四川	A、B
II 天山山地灰旱獭鼠疫自然疫源地	新疆	B
III 帕米尔高原长尾旱獭鼠疫自然疫源地	新疆	A
V 松辽平原达乌尔黄鼠鼠疫自然疫源地	吉林、黑龙江、内蒙古、辽宁	A、B
VI 甘宁黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫自然疫源地	甘肃、宁夏	A、B
VII 内蒙古高原长爪沙鼠鼠疫自然疫源地	内蒙古、宁夏、陕西、河北	C
VIII 锡林格勒高原布氏田鼠鼠疫自然疫源地	内蒙古	A
IX 滇西北山地大绒鼠鼠疫自然疫源地	云南	B
X 滇西居民区黄胸鼠鼠疫自然疫源地	云南	B
XI 青藏高原青海田鼠鼠疫自然疫源地	四川	A

征、宿主、传播媒介并结合地形、地貌等环境因素利用糖酵解、营养型、内毒素等指标将我国的鼠疫菌划分为 17 个生态型,分属于 10 个疫源地^[6-8]。2000 年又新增加了一种疫源地——青藏高原青海田鼠鼠疫自然疫源地^[9]。这种分型方法反映了我国鼠疫菌与外环境的密切关系,具有极大的流行病学意义。对我国的鼠疫防治发挥了较大的指导作用。随着分子生物学的发展,各种分子生物学技术广泛地用于细菌的分型工作中。核糖体分型是近年来在微生物领域应用最广泛的分型方法之一,在许多细菌中核糖体分型已经成为比较经典的分型方法^[11-14]。该方法在鼠疫菌的研究中也曾有报道。Guiyoule 等^[4,5]在 1994 年曾经应用该方法对鼠疫菌的流行进行了调查,表明这种方法具有稳定性、重复性及可分型性。

在本研究中,应用该方法把分离自我国不同疫源地的鼠疫菌分成了三个不同的核糖体型。核糖体型与我国的疫源地及生态分型之间有一定的对应关系。从结果来看,基本上是一种生态型对应一种核糖体型,一种生态型对应两种核糖体型的情况较少见,只在两种生态型中出现(松辽平原 A 型和黄土高原 B 型)。同样,在我国的鼠疫自然疫源地内,同一疫源地对应两种核糖体型的情况也不多,只有青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地、松辽平原达乌尔黄鼠鼠疫自然疫源地及甘宁黄土高原阿拉善黄鼠鼠疫自然疫源地内存在这种情况,而后两种疫源地内主要是核糖体 A 型占优势,B 型的出现仅为个别现象,估计为偶然因素影响进入该疫源地。而在青藏高原喜马拉雅旱獭鼠疫自然疫源地内,A、B 两种核糖体型的鼠疫耶尔森菌平分秋色,西部(冈底斯

山型、昆仑山型)主要为 A 型,东部(青藏高原型、祁连山型)则以 B 型为主。

核糖体型在鼠疫自然疫源地内比较稳定,例如天山山地灰旱獭鼠疫自然疫源地中的菌株,分离时间跨度近 30 年,分离宿主也不尽相同,而核糖体型皆为 B 型;其他疫源地情况与之大致相似,核糖体型都极为稳定。根据这一特点,我们也可以用于判断一个疫源地内发生的鼠疫,是它固有的鼠疫菌引起的,还是由外面输入的,从而有助于快速的查找出传染来源,采取相应的措施。

此前我们在对四川省石渠县分离的鼠疫菌进行的研究已经显示出了核糖体分型在这方面的作用^[10]。在该项研究中,由于从患者分离的鼠疫菌与从当地主要宿主青海田鼠分离的菌株核糖体型不一致,结合其他情况得出结论,患者感染的鼠疫并非由当地菌株引起,而是从外地输入的。该结果也为判定青海田鼠疫源地的性质提供了重要的参考依据。在该研究中我们选取了部分全国其他地方的菌株与其进行对比,与本项研究结果比较发现,当时选取的对照菌株皆为核糖体 B 型,与该患者体内分离的鼠疫菌核糖体型一致。而青海田鼠体内分离的菌株皆为核糖体 A 型。与本试验结果一致。

从图 2 可以看出,鼠疫菌核糖体型在我国分布具有明显的地域性。B 型在我国从西北到东南的广大地域内都有分布,其中间隔着大片不存在鼠疫的地区。C 型的分布区域紧邻 A 型分布区。从图 1 可以看出,A 型与 C 型的图型极为相似,它们与 B 型的差别最大,结合其地理分布可以推测,A、B、C 三型具有不同的起源,而 A 型与 C 型的亲缘关系更近一些。

应该说明的是,分析系统还把相当一部分鼠疫菌识别为假结核耶尔森菌,这是由于鼠疫菌与假结核耶尔森菌在生物学上确为一个种,其 DNA 同源性高达 90% 以上,在分类学上曾把鼠疫菌作为假结核耶尔森菌的一个亚种,但这两种细菌引起的疾病却截然不同,引起鼠疫的致病决定因子与 rRNA 无关,故在本方法中系统把鼠疫菌识别为假结核耶尔森菌并不奇怪^[1-3,8]。在本研究中,所有被识别为假结核耶尔森菌的鼠疫菌株皆为核糖体 A 型,可见核糖体 A 型的鼠疫菌与假结核耶尔森菌的亲缘关系更为接近。

本文所讨论的核糖体分型方法,是一种较为稳定、较不敏感的分型方法,在我国鼠疫疫源地中的分

布相当稳定,它还不能反映在已有的生态分型方法中所反映出来的特征。把这种方法与更为敏感多变的分型方法结合使用,可以更有效地探讨不同地区不同时间分离的鼠疫菌株间的差异,并可反映出其间的演化过程。

(本项研究在分析仪器及技术方面得到杜邦公司的大力支持,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Bercovier H, Mollaret HH, Alonso JM, et al. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Y. pseudotuberculosis*. *Curr Microbiol*, 1980, 4: 225-229.
- 2 Ibrahim A, Goebel BM, Liesack W, et al. The phylogeny of the genus *Yersinia* based on 16s Rdna sequences. *FEMS Microbiol. Lett*, 1994, 114: 173-177.
- 3 Buchrieser C, Rusniok C, Frangeul L, et al. The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Infect Immun*, 1999, 67: 4851-4861.
- 4 Guiyoule A, Grimont F, Iteman I, et al. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 634-641.
- 5 Guiyoule A, Rasoamanana B, Buchrieser C, et al. Recent

- emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 2826-2833.
- 6 纪树立, 贺建国, 白兴, 等. 中国鼠疫自然疫源地的发现与研究. *中华流行病学杂志*, 1990, 11(特刊 1号): 1-42.
- 7 纪树立, 张海峻, 刘云鹏, 等. 中国鼠疫菌分型及其生态学流行病学意义. *中华流行病学杂志*, 1990, 11(特刊 1号): 60-66.
- 8 纪树立, 主编. 鼠疫. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 207-209.
- 9 刘振才, 海荣, 李富忠, 等. 青藏高原青海田鼠鼠疫自然疫源地的发现与研究. *中国地方病防治杂志*, 2001, 16(6): 1-6.
- 10 蔡虹, 魏建春, 夏连续, 等. 石渠县鼠疫菌 rRNA 基因指纹图分析. *中国地方病防治杂志*, 2001, 16(特刊): 41-42.
- 11 Wilson KH, Blichington R, Hindenach B, et al. Species-specific oligonucleotide probes for rRNA of clostridium difficile and related species. *J Clin Microbiol*, 1988, 26: 2484-2488.
- 12 Stackebrandt E, Charfreitag O. Partial 16s rRNA primary structure of five Actinomyces species: phylogenetic implications and development of an Actinomyces israelii-specific oligonucleotide probe. *J Gen Microbiology*, 1990, 136: 37-43.
- 13 Stull TL, Lipuma JJ, Edlind TD. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: Ribosomal RNA. *J Inf Dis*, 1988, 157: 280-286.
- 14 Bingen EH, Denamar B, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev*, 1994, 7: 311-327.

(收稿日期 2003-01-28)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

新疆阿勒泰市幼儿园儿童肠道寄生虫病感染调查

伊力哈木 艾明

为了解阿勒泰市幼儿园儿童的肠道寄生虫感染情况,我们于 2002 年 5~6 月按“全国人体寄生虫分布调查”的要求和方法,对我市幼儿园儿童进行了抽样调查。

1. 调查对象与方法 本市所有幼儿园(地质单位)常住儿童为对象,进行各种寄生虫调查:①粪检碘液直接涂片法,主要调查肠道原虫,改良加藤法(kato-kaer)查各种蠕虫卵及试管滤纸培养法,查钩虫及其他线虫卵;②透明胶纸拭肛法,查蛲虫和带绦虫卵,只查 12 岁以下儿童;③免疫学诊断方法采用皮内试验查包虫病抗体,抗原由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心供给。

2. 结果:共调查了 285 名儿童,查出寄生虫带虫者 93 例,阳性率为 32.6%,其中原虫 3 种,有蓝氏贾第鞭毛虫(1.40%),溶组织阿米巴(4.21%),结肠内阿米巴(1.75%),蠕虫 2 种,蛔虫(1.40%),蛲虫(23.85%)。①性别分布:肠道寄生虫阳性率,男性 27.32%(37/135)女性 37.30%(56/150)经统计学处理差异无显著性($P > 0.05$);②虫相分布:

各种寄生虫的感染情况不同,蛔虫 4 例、蛲虫 68 例、蓝氏贾第鞭毛虫 4 例、结肠内阿米巴 5 例、溶组织内阿米巴 12 例;蛲虫感染率最高可达 23.85%,其次为溶组织阿米巴虫为 4.21%,其他虫种感染率基本相同;③试管滤纸培养均为阴性;④拭肛法蛲虫卵检出结果,对 12 岁以下儿童进行透明胶纸拭肛 285 人,阳性 68 例,阳性率为 23.85%。

3. 结论:此次调查发现 5 种人体寄生虫,总感染率为 32.6%,发现原虫 3 种,蠕虫 2 种,蛲虫的感染率为 23.85%,蛲虫卵的发现以透明胶纸拭肛法优于粪便检查法。以上数据已摸清了阿勒泰市幼儿园儿童肠道寄生虫基本情况,为寄生虫病防治工作提供了重要科学资料。由于环境卫生及个人卫生和防护条件较差,幼儿园儿童用的餐具、玩具及卫生设备消毒不严等,是造成肠道寄生虫传播流行的主要因素。因此,加强粪便管理,搞好环境卫生、饮水和个人卫生是预防肠道寄生虫病的重要措施。

(收稿日期 2003-03-27)

(本文编辑:尹廉)