

贵州省伤寒沙门菌分离株 16s 核糖体基因型的多态性及其流行病学意义

田克诚 阚飙 胡伟 董亦兵 吕太富

【摘要】 目的 探讨贵州省不同时间、不同地区伤寒流行菌株的遗传多态性及内在联系。方法 利用 southern 杂交技术,对贵州省 9 个地区 26 个县、市 1959~1999 年伤寒沙门菌分离株进行染色体 DNA 基因限制性酶切 16s rDNA 探针杂交图谱分析及药物敏感性试验。结果 分析发现选择的 209 株分属 26 个 RT 型,以 RT1 和 RT2 为优势型,在局部发生伤寒流行时,均由独特 RT 型引起。耐药菌株以 RT7 和 RT1 型为主。结论 贵州省不同地区、不同时间的分离菌株在核糖体杂交图谱上有明显的多态性,分析认为具有多重耐药性以及存在众多克隆群菌株是引起贵州伤寒发病率居高不下的主要原因。

【关键词】 伤寒沙门菌,流行病学,分子,核糖体基因分型

Diversity of 16s rDNA ribotypes of the *Salmonella typhi* strains isolated in Guizhou province TIAN Kecheng*, KAN Biao, HU Wei, TONG Yibing, LU Taifu. *Guizhou Provincial Anti-epidemic Station, Guiyang 550004, China

【Abstract】 Objective To analyses the genetic diversity and relationship of *Salmonella typhi* strains isolated from different years and districts in Guizhou province. **Methods** Ribotyping with 16s rDNA probe was used to describe the diversity of the 209 strains which were isolated in 26 counties of Guizhou province, from 1959 to 1999. The antibiotics resistance was also studied. **Results** Twenty-six ribotypes were found in all 209 strains, with two dominant types. The strains isolated from local typhoid epidemics belonged to the unique Ribotypes. The major ribotypes of the resistant strains were RT7 and RT1. **Conclusion** The *Salmonella typhi* isolates from Guizhou diverged obviously. The abundant clones and multi-resistance of the strains might serve the major reasons of the high morbidity of typhoid in Guizhou.

【Key words】 *Salmonella typhi*; Molecular epidemiology; Ribotyping

伤寒是贵州省最常见的急性肠道传染病,解放初期,全省年发病率仅 5/10 万左右。20 世纪 70 年代后逐年上升,1987 年达 98.85/10 万,发病率超过 100/10 万的就有 23 个县(市)随后全省发病率波动在 50/10 万至 100/10 万之间达 5 年之久。此间,区域性爆发时有发生,1985 年安顺市发病率达 1 339.21/10 万,1991 年纳雍县发病 5 976 例,1998 年威宁县 4 个乡镇爆发性流行,发病 3 500 多例。1995~1999 年,全省年发病率仍维持在 20/10 万至 40/10 万的较高水平。贵州西部的安顺、六盘水、毕节、黔西南 4 个地(州、市)区已经成为伤寒的常年流行区。如何控制伤寒的流行是贵州疾病控制中的突出问题。用分子流行病学方法分析不同时期、不同地区,甚至不同流行事件中菌株间基因组上的相似

程度,能够进一步揭示流行的内在规律,鉴别传染来源与追踪传播途径。利用 16s 核糖体(16s rRNA)基因(16s rDNA)杂交图谱分析细菌基因组的差异,是目前最常用的方法^[1-3]。该方法虽只反映基因组的部分变异,但鉴于细菌基因组非常庞大,这些方法仍具有很强的实际意义。因此,利用相对保守的 16s rRNA 基因探针针对伤寒沙门菌(*S. typhi*)分离株的 DNA 基因进行杂交图谱多态性研究,结合具体的流行病学资料,以求阐明贵州省不同时间和地区伤寒流行的内在联系。

材料与方法

1. 菌株:贵州省卫生防疫站收集保存的 *S. typhi* 按分离株的年代和地区选择 209 株作为实验菌株,这些菌株覆盖了全省 26 个县(市),其中按地区(市)贵阳共 34 株、六盘水 9 株、遵义 16 株、铜仁 7 株、黔西南地区 14 株、毕节 48 株、安顺 73 株、

作者单位:550004 贵阳,贵州省卫生防疫站流行病防治研究所(田克诚、胡伟、董亦兵、吕太富);中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所(阚飙)

黔东南地区 1 株、黔南地区 7 株。标准菌株由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供,编号 *S. typhi* 50319。

2. 试剂:限制性内切酶 PstI, Taq DNA 聚合酶、dNTP 及 Lambda DNA/Hind III marker(分子量标准)购自华美生物工程公司;地高辛(Dig)DNA 探针标记与检测试剂盒为 Roche 公司产品;硝酸纤维素膜(0.45 μm)为北京化工学校附属工厂产品;细菌染色体 DNA 提取试剂盒为美国 Promega 公司产品。

3. 方法:

(1) PCR 扩增及探针制备: *S. typhi* 的 16s rRNA 基因扩增参考大肠埃希菌 16s rRNA 基因序列设计引物(由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供)扩增全基因片段,产物长 1.5 kb。扩增引物序列为引物 1 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3',引物 2 5'-AAG GAG GTG ATC CAA CCG AG-3',扩增参数(PE9600 型 DNA 扩增仪)为 94℃ 预变性 4 min,然后 94℃ 变性 50 s,58℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 60 s,共进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。上述实验以 *S. typhi* 50319 染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物纯化方法见文献 [4],Dig 标记探针按 Dig DNA 标记与检测试剂盒说明书方法进行。

(2) Southern 转印杂交:菌株染色体 DNA 提取制备按细菌染色体 DNA 提取试剂盒说明书提供的方法进行。酶切反应按限制性内切酶使用说明书提供的反应条件进行酶切,酶切温度 37℃,时间 3~4 h,酶切总反应体积 20 μl。酶切后的染色体 DNA 进行琼脂糖水平电泳,电泳条件为 0.7% 琼脂糖、0.5× TBE 缓冲液、电压 3~4 V/cm,电泳时间 18~24 h。电泳后按文献 [4] 进行 DNA 的 Southern 转印,转印膜 56℃ 干烤 4 h 备用。16s 核糖体基因探针杂交按 Dig 标记检测试剂盒提供的方法进行。

(3) 聚类分析:得到的杂交图用 Phoretix ID Advanced 软件分析图谱的相似性。

结 果

1. *S. typhi* 核糖体型的分布:对 209 株 *S. typhi* 分离株染色体进行 16s rRNA 杂交后,发现不同年代、不同地区菌株在 16s rDNA 探针杂交图谱上有明显的多态性(图 1)。根据杂交的拷贝数及片段的大小差异得到 16s rDNA 核糖核酸型(ribotype, RT)。209 株分属 26 个 RT 型,每个 RT 型有 4~8 条不等的杂交带。最小的杂交带 6.9 kb,最大的杂交带 21.3 kb。分析发现 RT1、2 型分布较广泛,而有的 RT 型只存在某个年份中(表 1),1959 年有 9 个型,以后逐年减少;1981、1982、1984 年分别为 8、10、9 个型,以后又逐年减少;1985、1990 年均为 1 个型;1999 年又增至 5 个型。RT 型数随时间而不断变化。

表 1 贵州省 *S. typhi* 16s rRNA 核糖体型的
时间与地区分布

年份	菌株分离地区及核糖体型分布
1959	贵阳 RT2(3),RT6,RT9,RT10,RT11,RT15(2),RT19,RT20(2),RT23
1962	贵阳 RT2,RT3,RT21(2);毕节 RT2,RT14,RT15(2),RT16,RT21(3)
1963	毕节 RTX(7),RT3,RT10,RT13,RT21(6)
1973	安顺 RT2,RT9,RT10(7)
1974	毕节 RT21(9),RT26
1975	遵义 RTX(5);安顺 RT10(2)
1981	贵阳 RTX(2),RT17,RT22;六盘水 RT2;遵义 RT21;黔西南 RT10;毕节 RTX(3),RTX(4),RT14;安顺 RTX(2);黔南 RT2
1982	黔西南 RT1,RT10(2),RT20(3),RT23,RT24,RT25;六盘水 RT1,RTX(2),RTX(2);安顺 RTX(2),RT2,RT11,RT18
1984	贵阳 RT11,RT12;遵义 RT2(4),RT6(3);铜仁 RT1(5),RT18;毕节 RT13;安顺 RTX(6),RTX(2);黔东南 RT10
1985	安顺 RTX(7)
1986	遵义 RT7,RT10(2);铜仁 RT13;黔西南 RT7(4);安顺 RT7(7);黔南 RTX(3),RTX(2),RT10
1990	六盘水 RT1(3)
1995	安顺 RTX(3),RTX(4)
1997	安顺 RTX(6),RT2,RTX(2)
1998	贵阳 RTX(11);毕节 RT1(5);安顺 RT2
1999	安顺 RTX(8),RTX(4),RTX(2),RT4,RT5

注:括号内的数字为菌株数,无括号表示该型只有 1 株菌

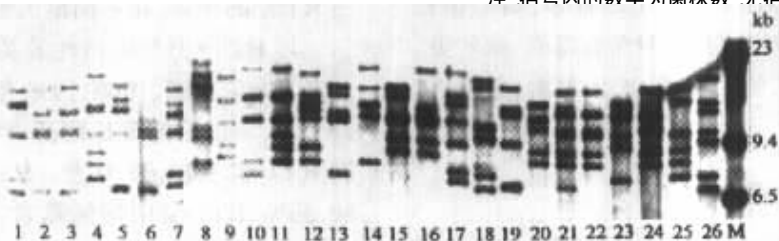


图 1 209 株 *S. typhi* 16s rRNA 基因探针杂交核糖体分型图谱

RT1、2 亦广泛存在于各个地区,有些 RT 型则只出现在某个地区,如 RT5、8、12、14、16、17、24、25、26

等,而各地区(市)的 RT 型数,以常年均有发病的地区较多,如贵阳有 15 个型、毕节和安顺 11 个型、黔

西南 7 个型。在 26 个 RT 型中, RT1、2、7、10、21 型分别占 21.05%、19.62%、10.53%、8.61%、10.04%。RT7 只出现在 1985、1986 年的大流行中, 以后未再发现。

2. RT 型间的聚类: 通过 RT 型聚类分析(图 2), 可见 RT1 与 RT2、RT10 与 RT11、RT21 与 RT22、RT12 与 RT24 以及 RT25 与 RT26 型两两间遗传相似性较高, 整体分析遗传差异度较大且分散。

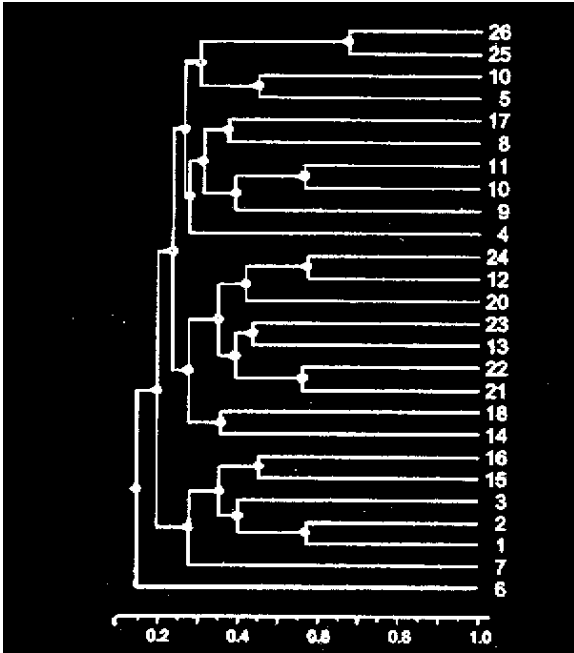


图 2 贵州省 *S. typhi* 分析菌株的 26 个 16s rRNA 核糖体型的聚类图

3. RT 型与耐药性的关系: 1985 年由耐药菌株引起的伤寒大流行前, 贵州只有少数年份和地区出现耐药菌株, 此后在 1986、1990、1998 年均发生由耐药菌株引起的大流行。在 26 个 RT 型中 RT1、2、7、10、21 有耐药菌株, 以 RT1、RT7 的较多, 耐药谱较广包括耐卡那霉素、氨苄西林、羧苄青霉素、痢特灵、复方新诺明、四环素、强力霉素、庆大霉素、氯霉素、链霉素等。

讨 论

1. *S. typhi* 分离株 16s rDNA 基因分型: 贵州省 209 株 *S. typhi* 分离株分属 26 个 RT 型, 以 RT1、2 为优势型, 占菌株总数的 46.67%, 其他型别较分散。

2. RT 型的时间与地区分布: 贵州省 *S. typhi* 分离株 RT 型的时间与地区分布可见都有各自优势的 RT 型, 局部发生流行时, 均有独特的 RT 型。1973 年, 清镇县由 RT10 型引起; 1974 年, 织金县由 RT21

型引起; 1985 年安顺市由 RT7 型引起; 1998 年, 贵阳市和威宁县都由 RT1 型引起。RT2 在贵阳、六盘水、遵义、毕节、安顺、黔南 6 个地区(州、市)的不同年代都引起过局部流行。1981 年, 在安顺首次出现 RT1 型, 随后相继在黔西南、六盘水、铜仁、贵阳和毕节流行。1985 年安顺地区首先发现 RT7 型引起的爆发性流行, 1986 年 RT7 型出现于全省各地区, 但随后未再发现由 RT7 型引起的流行。是遗传分化的改变或此型菌株消失, 还是菌株收集不全, 有待进一步监测。

1999 年 5、6 和 8 月, 从安顺的 3 个乡镇分离的菌株推测, 是由 RT1 型的连续传播引起的局部流行, 而与安顺毗邻的镇宁的 2 个乡镇, 同年 8 和 9 月分离的伤寒菌株分别是 RT2、3 和 5 型。分析 2 个县(市)的局部流行, 是由早已存在的各自的 RT 型引起。RT1、2、7、10、21 型菌株占试验菌株的 69.86%, 表明它们具有引起广泛流行的内在潜力, 这种流行趋势是否通过耐药性、侵袭力和对理化因子的抵抗力的表型表现出来, 还是自然菌群在人群中的机会性传播, 还需要进一步更详细的监测。由于多个 RT 型的存在而引起连年不断的局部流行是贵州省伤寒发病居高不下的主要原因之一。

3. RT 型间的聚类分析: 16s rRNA 基因杂交聚类图显示了不同 RT 型 *S. typhi* 菌株遗传的相似关系。贵州流行的 RT 优势型以 RT1、2 遗传距离较近, RT1、2、7 等聚集成一大类; RT10 等与 RT21 等分别聚为两大类, 聚集较分散。三类之间的遗传距离相差较远。由此看来贵州省 *S. typhi* RT 型别复杂, 各地本来就存在的 RT 型, 随着时间的推移和某一 RT 型的积累, 在不同地区轮流引起伤寒流行。

4. RT 分型与耐药性的关系: 各年菌株中只有 1975、1985、1986、1990、1998 年出现耐药菌株, 其中以 1985 年以后的菌株耐药谱较广。耐药性菌株又以 RT7 和 RT1 型为主。RT7 型中耐氯霉素占 86.36%; RT1 型中耐氯霉素占 15.91%, 而且发生在 1990 年以后; RT7 只出现在 1985、1986 两年, 此时 RT1 型在监测的范围内没有出现, 呈现明显的菌群取代。1998 年威宁县的 RT1 型耐氯霉素, 贵阳市的 RT1 型对氯霉素又敏感, 这说明 *S. typhi* 菌株相同 RT 型发生了耐药特征上的改变, 提示型内菌株的基因突变, 或可能通过基因片段的菌株间水平获得了新的基因或丢失了已有的基因。

通过分析, 同一年在同一地区往往有多个型别

(克隆群)的菌株,另外对于一年中菌株型别较少的情况,可能是实际发生的情况(当年由少量克隆群的菌株引起扩散),但也不能排除监测不够灵敏、分离菌株较少和不够全面的情况。不同克隆群或 RT 型致病菌株的消长除与本身的生存、致病力特征相关外,与人群的一些条件诸如经济发展水平、卫生条件、卫生干预以及免疫力水平等都有关系,是自然条件与社会条件的综合作用的结果。因此,为揭示贵州伤寒流行的内在规律,更科学、有效地控制伤寒流行,必须进一步全面系统地开展病原学与人群流行病学监测。

(本文实验室技术得到中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所刘延清研究员,刘朋、刘忠华硕士及章雨娟副

主任技师的指导帮助,特此致谢)

参 考 文 献

- 1 Tompkins LS, Troup N, Labigne-Roussel A, et al. Cloned, random cheomosomal sequence as probes to identify *Salmonella* species. J Infect Dis, 1986, 154: 156.
- 2 Tenover FC. Diagnostic deoxyribonucleic acid probes for infectious diseases. Clin Microbiol Rev, 1988, 1: 82.
- 3 徐文斌, 祁国明, 刘延清, 等. 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. 中华流行病学杂志, 1995, 16: 29-35.
- 4 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 321-475.

(收稿日期 2001-04-09)

(本文编辑: 张林东)

· 短篇报道 ·

轮状病毒肠炎的肠外并发症

武际英 陈莉 马建华

轮状病毒(RV)是引起婴幼儿腹泻的主要病原之一, RV 可在肠道感染的基础上并发肠外多系统器官的疾病。这提示 RV 可能存在新的感染途径和感染机制, 近年来本院诊治轮状病毒肠炎 52 例, 报告如下。

1. 临床资料: 观察对象均系秋冬季急性婴幼儿腹泻住院的病例, 证实轮状病毒肠炎的患儿 52 例, 年龄 3 个月至 2 岁, 男 27 例, 女 25 例, 1 岁以内 37 例(占 71.2%)。性别之间发病差异无显著性。伴发肺炎 10 例, 中枢神经系统感染的 4 例, 心肌酶增高、心电图有改变的 6 例。

2. 结果: 在治疗过程中, 10 例患儿出现咳嗽伴气喘, 肺部听诊闻及明显的哮鸣音及中小水泡音。胸片示有肺炎表现。体温正常。有 5 例出现不同程度的惊厥, 体温基本正常。5 例做了血培养、血生化检查、脑电图(EEG)、颅脑 CT 扫描, 1 例为低钙惊厥, 3 例 EEG 有不同程度的广泛弥漫性改变, δ 波及 θ 波为主的异常。颅脑 CT 扫描, 有 2 例脑实质有低密度灶、脑水肿的表现, 血培养阴性。经治疗后复查脑水肿消失。1 月后复查 EEG、CT 基本恢复正常。

3. 讨论: 轮状病毒感染合并其他器官的损伤也应引起重视。轮状病毒性肠炎能引起脑炎、心肌炎、肺炎。4 例发生重症 RV 脑炎患儿, 临床上除胃肠道症状外, 以反复顽固的无

热惊厥为主。国内报道很少, 国外有报道, 发现 RV 感染惊厥的病例 EEG 呈广泛慢波增多外, 脑脊液中除 RV 特异性抗体滴度明显升高外还发现了 RV 颗粒, 脑炎症状和体征随肠炎的治愈而消失。重症 RV 肠炎患儿和免疫功能低下者 RV 可能感染中枢神经系统和心肺而加重病情, 及时准确地诊断, 不仅能指导治疗, 还能及早阻止 RV 扩散, 避免重要器官损害。

RV 可感染人和多种动物, 主要通过粪-口途径或人与人间接感染, 尚可考虑呼吸道传播途径, 临床和流行病学特征均表现 RV 感染可累及呼吸道, 有人报道 RV 感染有 40% 伴有呼吸道症状, 在 RV 感染流行期间急性喉炎及肺炎均有发生, 在 RV 肠炎患儿的鼻咽部冲洗物中, 检测出 RV。许多资料表明 RV 可进入血循环引起病毒血症, 出现全身症状, 表现为头痛、呕吐、心脑血管组织中毒。此时患儿体内干扰素和特异抗体的出现产生一定的抵抗力, 腹泻可能就此痊愈。如不能产生足够的抗体或血脑屏障功能不全, 则病毒经血循环进入中枢神经系统引起脑炎, 进入循环系统和呼吸系统则引起心肌炎、肺炎, 也可引起肠道外的其他消化器官损伤。病毒血症是一过性的, 血培养不易检查到与腹泻同一的病原。这些资料大多为临床报道尚缺乏可靠的理论依据, 还有待于进一步深入研究。

作者单位 250013 济南市中心医院儿科

(收稿日期 2001-09-11)

(本文编辑: 张林东)