

我国12省市伤寒噬菌体型别的分布

北京市卫生防疫站

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所

利用伤寒杆菌ViⅡ型噬菌体的诱导变异体,对Vi抗原丰富的伤寒杆菌进行分型,已有四十多年的历史。Craigie和Yen等用通过适应变异的方法获得了24个分型用噬菌体^[1,2]。当时仅有24个型,以后不断发展,目前国际上已近100个型分型噬菌体。我国曾用33型伤寒杆菌噬菌体进行分型,做了大量工作。近来,由国外引进一套96型的伤寒杆菌分型噬菌体,由北京市卫生防疫站与中国预防医学中心流行病学微生物学研究所协作,对12个省、市的伤寒杆菌进行了噬菌体分型,初步掌握了我国伤寒杆菌噬菌体型的分布情况及其主要流行型等。现将方法、结果报告如下:

材料与方 法

一、菌株来源:北京144株;河北37株;河南161株;山东20株;江苏7株;浙江34株;四川18株;云南42株;辽宁10株;吉林39株;黑龙江140株(齐齐哈尔44株);内蒙18株,共计670株。以上菌株的Vi抗原都比较丰富。

二、分型噬菌体及标准菌株:引自英国Anderson ES实验室。

三、伤寒沙门氏菌因子血清:为北京生物制品所、成都生物制品研究所生产,均在有效期内。

四、培养基:①肉浸液肉汤及琼脂;②蛋白胨琼脂及软琼脂;③血琼脂平板;④鸡蛋斜面;⑤稀释液^[5]。

五、分型技术⁽⁴⁻⁶⁾:根据1938年Craigie及Yen氏报告的操作方法^[1]和1956年Anderson等的系统报道^[3-6]为基础,结合本实验室的具体情况加以应用。

1.菌株的鉴定与处理:新分离含有Vi抗原的菌株,应及时进行分型,如不能立即分型,必须冷冻干燥或用鸡蛋斜面保存,以保留Vi抗原。

鉴定时,先将菌株接种于血琼脂平板上,37°C培养18~24小时,挑选几个光滑菌落混合进行血清玻片凝集试验,Vi抗原丰富者可用于分型,凡丢失Vi抗原的菌株,可用下列的某一种方法处理:

①在血琼脂平板上连续传代;

②将菌株接种在2毫升肉汤中,37°C培养4小时,肉汤稍混浊时即取出,2,000转/分离心30分钟,用接种环取上清液接种于血琼脂平板上,经培养后挑选光滑菌落;

③接种小白鼠腹腔,死后解剖小白鼠取心血分离。

2.噬菌体增殖法:可根据需要和实验室具体情况选用下列方法:

①单管增殖法:于5~10毫升肉浸液肉汤中加入0.5毫升标准噬菌体液及1毫升相应标准幼龄菌(并设对照管——不加噬菌体)。37°C~38°C孵育2小时后开始观察,以后每隔半小时左右观察一次,与对照管比较,增殖管在混浊后变澄清者或不再变清者及时取出,加氯仿2~3滴,充分振荡摇匀后,吸出上清液,58°C灭活40分钟,离心,测定效价如达到 10^{-3} ~ 10^{-4} 以上,可保存于低温冰箱备用。如未达到所需效价,则应再反复增殖或改用系列稀释法或软琼脂法提高效价。

②系列稀释法,见文献^[12]。

③软琼脂双层法,见文献^[4,5]。

3.测定噬菌体的常规试验滴度(RTD)的

方法：见文献[5,6]。

4. 制订实验室自用分型表：由于标准Vi菌株有不同程度的退变现象，以及各实验室的操作技术和条件有所不同，所以在应用国际分型表检索噬菌体型别时，还必须参考用平板法交互裂解试验制订的实验室自用分型表。

5. 伤寒菌株的噬菌体分型鉴定：

① 将含有Vi抗原的伤寒菌株鸡蛋斜面培养物转种到新鲜血琼脂平板上，经血清学鉴定含有丰富Vi抗原者，挑取几个光滑菌落混合接种于肉浸液肉汤内，37°C 孵育2~4小时。

② 将上述菌液均匀涂布于预先烘干37°C 烤1.5~2小时左右的肉浸液琼脂平板上，并于皿底作好各型噬菌体标记，稍待干，用接种环分别取RTD各型噬菌体一满环，轻轻加于菌层上，干后放37°C 孵育8~10小时(或用间歇培养法)，记录结果，根据国际噬菌体分型表并参考本实验室分型表判定噬菌体型别。

结 果

一、我国12省、市主要噬菌体型别及各型所占百分比：从12省、市收集到伤寒菌株Vi抗原较为丰富者共有670株，有617株能定型，其中有10株目前尚未定型，分型率为92.09%，不裂解者有53株，占7.91%(表1)。

共分33个型(增B族，因无法分B₁B₂等)，A型占33.87%；D型占13.94%；D₁型占11.51%；K₁型占10.70%；E₁型占9.72%。其它型别均在5%以下。

二、分地区的噬菌体型别及百分比：各地的噬菌体型别多寡不一，以北京最多(18个型)，其次为黑龙江省(10个型)，河南(8个型)，云南(7个型)，最少的为江苏、浙江、内蒙、辽宁等，仅为2~3个型(表2)。

现将各省、市的主要型别分述于下：

北京市18个型，A型最多(40株，30.8%)，其次为D₁型(26株，20.0%)，E₁型为第三位(22株，16.9%)。

河北省5个型，以D₁、A、D₂为主，分别为

表1 我国十二省、市部分伤寒杆菌噬菌体型的分布

省、市	A	B ₂	B ₃	B	C ₁	C ₂	C ₄	D ₁	D ₂	D ₃	D ₆	D ₈	D ₉	D ₁₀	E ₁	E ₂	E ₃	E ₇	E ₁₁	F ₁	F ₂	F ₆	H	O	J ₁	J ₅	K ₁	L ₁	L ₂	M ₁	M ₄	T	28	36	未定	不裂解	总计	分型率 (%)		
北京	40	2			1	1	26	9			5	22						7			2	1	2			2	3	2	1	3				1	14	144	90.27			
河北	11						15	4																			3								1	37	97.29			
河南	32						11	33																											3	161	98.14			
山东	2																																		2	20	90.00			
江苏	2																																		3	7	57.14			
浙江																																				8	34	76.47		
四川	1																																		2	18	88.88			
云南																																			1	42	97.61			
内蒙	17																																			18	100.00			
宁夏	8																																			10	100.00			
黑龙江	79																																			17	8	140	87.86	
吉林	17																																			5	39	94.87		
计	209	2	23	3	2	1	1	71	86	1	1	1	1	1	7	60	1	1	8	1	1	2	1	2	1	1	9	6	66	1	3	8	1	2	1	5	53	10	670	92.09

表 2 12省、市伤寒噬菌体型的分布

地 点	较 多*	较 少	株 数
北 京	A, D ₁ , E ₁	D ₂ , E ₇ , D ₁₀ , B ₂ , C ₁ , C ₄ , F ₂ , F ₆ , H ₂ , J ₁ , J ₅ , K ₁ , L ₁ , L ₂ , M ₄	144
河 北	D ₁ , A, D ₂	E ₁ , J ₅	37
河 南	K ₁ , D ₂ , A, H	D ₁ , D ₈ , D ₉ , J ₁	161
山 东	D ₂ , A	E ₁ , E ₁₁	20
江 苏	A, D ₂		7
浙 江	E ₁	D ₂ , O	34 [△]
四 川	D ₁ , D ₂	A, E ₁ , E ₇ , K ₁	18 [△]
云 南	B ₃ , M ₁	E ₁ , D ₁ , D ₂ , T, 28	42
内 蒙	A	D ₆	18
辽 宁	A	E ₁ , E ₂	10
黑 龙 江	A, D ₂	B, C ₁ , D ₁ , D ₁₀ , E ₁ , E ₂ , E ₃ , F ₁	140 [△]
吉 林	A, K ₁ , 36	D, E ₁ , J ₁	39

注: *当地噬菌体型组成比在10%以上, △包括未定型菌株。

15株(41.7%)、11株(30.6%)和4株(11.1%)。

黑龙江省有10个型(140株中有46株为齐齐哈尔市收集的菌株),以A型为主(79株,64.2%),其次为D₂(20株,16.2%)。其它型较少。

云南省以B₃型为主(23株,56.1%),其次为M₁型(8株,19.5%)。

吉林省以A型为主(17株,45.9%),其次为K₁型(8株,21.6%),36型为第3位(5株,3.5%)。

四川省以D₁型为主(9株,56.3%)。

内蒙、山东、浙江、辽宁四省噬菌体型别较为集中。内蒙以A型(17株,94.4%)为主;山东以D₂型(14株,77.8%)为主;浙江以E₁型(23株,88.5%)为主;辽宁以A型(8株,80.0%)为主。

江苏省的菌株较少, A、D₂型占二株。

河南省的菌株来自23个县市, Vi抗原较为丰富者有161株,其中158株定了型占98.14%。共有8个型(A、D₁、D₂、D₈、D₉、H、J₁和K₁),以K₁型为主(55株,34.81%),D₂型占第2位(33株,20.87%),A型为第3位(32株,20.25%)。

三、主要噬菌体型的地区分布:共获33个(包括B族)噬菌体型,其中仅有4个型在较多的省、市有所发现,即A型分布在10个省、市(黑

龙江、北京、河南、吉林、内蒙、河北、辽宁、山东、江苏、四川); D₂型分布在9个省、市(河南、黑龙江、山东、北京、河北、江苏、四川、浙江和云南)。E₁型也分布在9个省、市(浙江、北京、云南、吉林、河北、辽宁、山东、四川和黑龙江)和D₁型分布在7个省、市(北京、河北、河南、四川、黑龙江、吉林和云南)。其次J₁、K₁型分别见于3、4个省、市,即J₁型见于河南、北京和吉林; K₁型见于河南、吉林、北京和四川;其它各型均分布在1~2个省市。具体型别及地点如下: B、C₁、E₂、E₃、F₁仅在黑龙江省分离到。B₂、C₂、F₂、F₆、L₁、L₂、M₄: 北京; D₆: 内蒙; D₈、D₉: 河南; E₁₁: 山东; O: 浙江; M₁、B₃、T、28: 云南; 36: 吉林; D₁₀: 北京、黑龙江; E₇: 北京、四川; H: 北京、河南; J₅: 北京、河北(表1)。

四、新发现的型别: 经上述12个省、市所查出的33个型与以往用33型噬菌体分型所作的实验结果相比较,有新的型别出现,如B₂、C₁、C₂、C₄、D₈、D₉、D₁₀、E₃、E₇、E₁₁、F₆、O、J₁、J₅、K₁、M₁、M₄、T、28和36等20个型,过去均未在我国文献中记载过[2,6-11]。

五、不同来源伤寒杆菌可分型率之差别: 北京市1980年的96株伤寒杆菌,从病人或带菌者分离到75株,有71株能定型(占94.67%),外环境污水中分离的21株,有14株能定型(占66.67%),两组间差异显著($\chi^2=12.678, p<0.01$)(表3)。

讨 论

用伤寒噬菌体对具有Vi抗原的伤寒杆菌进行分型,可用于追索伤寒传染源或传播途径[7],这对了解伤寒流行动态及控制该病的流行有较重要的意义。另外,由于噬菌体型在各地区有相对稳定性,在地区分布上有一定的特点,因此,在掌握本地区伤寒菌株的噬菌体型别的基础上,可判断流行株是本地区固有的或是由外地(包括国外)传入的。这是采取相应防疫措施的一项重要参考依据。

表 3

北京市1980年伤寒杆菌不同来源噬菌体分型情况

型	A	B ₂	C ₂	D ₁	D ₂	D ₁₀	E ₁	E ₇	H	J ₅	K ₁	L ₂	M ₄	可分型数 (%)	不能分 型数	计
病人及 带菌者	13	1	1	19	8	4	12	6	1	3	1	2		71 (94.67)	4	75
水	5			1			4	1	1			1	1	14 (66.67%)	7	21

显著性测验: $\chi^2 = 12.678$ $P < 0.01$

过去国内部分省市用33型伤寒噬菌体进行分型, 常见噬菌体型为A、D₁、D₂、E₁、E₂、D₅、G、T、M、K等, 共发现29型〔8〕。近来我们应用96型伤寒噬菌体对北京、河北、河南、山东、江苏、浙江、四川、云南、内蒙、辽宁、黑龙江、吉林等12省、市的伤寒杆菌的分型结果以A、D₂、D₁、K₁、E₁型比重较大, 分别为33.87%、13.94%、11.51%、10.70%和9.72%, 共发现33个型。与过去相比增加了型别并发现过去未见报道过的20个型。有的型别过去也分离到过同属噬菌体型的亚型, 也发现过去曾有报道而这次却未分离到者, 如D₅、G、X、27、29等, 这可能因菌种收集的地区、来源不同及变异等有关。这是首次应用96型噬菌体进行分型, 对我国各省市的伤寒杆菌进行选择性的分型工作, 查清我国伤寒菌噬菌体型别分布等有一定的参考价值。尤其在目前国际交往频繁的情况下, 对追踪该病的传入、输出都有很重要的意义。若能长期观察其动态, 对疾病监测可能有一定的辅助作用。

过去认为我国主要噬菌体型是A、D₁、D₂、E₁、M、G等, 根据本报告12省市的分型结果, 基本也是以A、D₂、D₁、E₁为主, 但K₁型的比重有所增加, 并为主要型别之一, 这可能因各省、市送检的菌种数量多寡不一所致, 如K₁型共有66株河南就有55株(83.3%)。

从表1可知, 采用目前噬菌体分型, 对伤寒菌的可分型百分率有所提高, 670株伤寒菌能定型的有617株(92.09%), 而过去用33型噬菌体进行分型时, 可分型率仅为70%左右。

12省、市的伤寒噬菌体型别多寡不一, 这可能与菌种收集范围的大小和流行特点有关,

如河南省来自20多个区县, 有各种流行形式, 因此噬菌体型较多。其主要噬菌体型为K₁(34.81%)。但内蒙、山东、浙江收集范围较小, 主要为爆发疫情, 故主要噬菌体型较为集中。如内蒙是1980年9月某矿区一次流行时收集的, 18株伤寒菌有17株属A型(占94.44%); 山东省20株菌来自五个县市, 其中有一县市的13株菌有12株为D₂型, 占92.3%。另外, 辽宁省10株菌有8株为A型; 黑龙江省64.2%的菌株定为A型; 四川省56.3%的菌株为D₁型; 云南省56.1%的菌株为B₃型; 吉林省45.9%为A型; 河北省41.7%为D₁型; 北京30.8%为A型。

12个省、市中, 型别最多者为北京市, 有18个型, 并发现10个新型(E₇、D₁₀、B₂、G、C₄、F₆、J₁、J₅、K₁、M₄); 黑龙江有10个型, 发现3个新型(C₁、D₁₀、E₃); 河南省8个型, 发现4个新型(D₂、D₉、J₁、K₁), 其它省、市都在6~7个型以下(表2)。这些新型是否早已存在, 尚需进一步查证。

来源不同的伤寒菌株, 其可分型百分率也有明显差别, 即患者带菌者之菌株可分型百分率(94.67%)高于外环境中的菌株(66.67%)见表3。这可能因菌株在外界自然环境中, 受某些理化因子及与其它微生物的相互作用, 使该菌产生抗原结构或某些特性方面的变异从而可能导致细菌对噬菌体敏感性的改变。

(李锦瑞 郑庆斯整理)

摘 要

1. 对北京等12省、市的670株伤寒菌进行了噬菌体分型, 共有33个型, 以A、D₂、D₁、K₁、E₁型为主;

发现新型20个。

2.几个噬菌体型地区分布较广,如A型见于10个省、市;D₂、E₁型分别在9个省、市;D₁型在7个省、市;K₁在4个省、市。

3.采用96型噬菌体分型,提高了对伤寒杆菌的分型百分率,可达92.09%。

ABSTRACT

670 strains of typhoid bacillus from 12 Provinces and cities, including Beijing, were identified by vi-phages. Thirty three types were found with a high prevalence of type A, D₂, D₁, K₁ and E₁. Twenty types of them were first isolated in China.

The distributions of some types were wider than that of others. Type A existed in 10 provinces and cities, D₂ and E₁ in 9, and D₁ in 7, while K₁ was only found in 4 provinces.

The application of 96 types of vi-phages for identification of typhoid bacillus increased the percentage of typing up to 92.09.

参 考 文 献

1. Craigie J et al: Canad pub Health J, 29: 448, 1938.
2. Craigie J et al: Canad pub Health J, 29: 484, 1938.
3. Yen CH: CMJ, 54: 330, 1940.
4. Anderson ES et al: Clin Path J 9: 94, 1956.
5. Adams MS: Bacteriophages, 395, London, 1959.
6. 医学科学研究所学友会编: 细菌学实习提要(日文)517, 丸善株式会社, 东京, 1976.
7. 島田俊雄等: ファーズ型別の原理と应用検査と技術, 7(4): 293, 1979.
8. 魏承毓: 对伤寒几个问题的探讨, 内部资料, 1980.
9. 耿贯一等: 流行病学中册, 116页, 1979.
10. 潘雪霖等: 中华卫生杂志, 4(4): 283, 1956.
11. 林永根: 中华医学杂志, 47(3): 187, 1961.
12. 董典顺等: 中华医学杂志, 44(6): 587, 1958.
13. 北京市防疫站: 卫生防疫微生物检验规程, 内部资料, 1975.

(北京市卫生防疫站参加工作的有: 张敬学、郑庆斯、刘建英、刘桂荣、李仲三; 中国预防医学中心流行病学微生物学研究所参加工作的有: 温世凡、张兰香、李锦瑞、于潜)

61例彝族克山病流行病学分析

四川省金阳县防疫站 赵纯必

本文收集1978~80年全县61例资料较完整的彝族克山病例, 其中男30例, 女31例; 年龄1~15岁, 皆系农民。2~5岁发病者48例, 占78.7%, 较2岁以下和6岁以上组发病率显著为高。

发病季节: 77%的病人集中在10月至翌年3月, 2月为发病高峰, 6月无病例。

近亲婚配: 61例中, 其祖、父辈等近亲结婚者24人, 占39.3%; 对照组为附近农村同年龄组非病家93人, 近婚仅3人, 占3.2%; 前者发病率显著高于后者。经追溯61例3~4代家族谱系, 共有成员1,248人, 因本病死亡181人, 其亲属发病率为14.5%; 其中先后发病2例者20家, 3~6例者分别为14家、8家、6家和2家, 12和13例者各1家; I代患3人, II代49人, III代63人, IV代66人; 一级亲属(直系)患病率为18.9% (144/763), 二级亲属(祖辈及叔、舅辈等)为7.8% (36/462), 三级亲属(堂、姨兄弟姐妹)为4.3% (1/23), 可见关系亲、疏发病率呈递减趋势。

多子女: 49例患者来自多子女户(4~8个), 其中先后发病2例或2例以上者13户, 占21.3%; 独生子女34户, 均无病例, 两者有显著差异; 多子女户生活较困难, 父母照顾不周, 营养不良儿多, 发病机会即多, 且病后难以抢救成功, 故病死率高。

营养: 食物成分、质量和来源影响着发病, 凡饮食单调、偏食、低营养(蛋白总热量低于1%)、多吃生冷不洁食品习惯等家庭病患多, 而蛋白总热量高于5%为非病家; 灾后食用非疫区粮食的村寨, 发病亦相对减少。61例病家中, 每人年平均蔬菜摄入量<1000克者36人发病, 占59%; <2500克发病25人, 占41%; 基本口粮不足者53人发病, 占86.9%; 对照组93人, 每人平均蔬菜摄入量>5000克, 且口粮有余, 水果较多, 则无病例。

生活习惯: 吸烟与发病无显著性差异; 61例中, 其家庭均有不良生活习惯, 卫生环境亦差; 93名健康者, 其家庭普遍有良好的卫生习惯, 环境差者仅32人, 前者发病率显著为高。