论著

文章编号:1000-5404(2013)02-0142-03

广西地区类鼻疽伯克霍尔德氏菌的分布调查

马广强,王 倩,朱金华,叶荷平,万红娇,汪建民 (330004 南昌,江西中医学院基础医学院病原生物学与免疫学学科组)

[摘要] **目的** 调查类鼻疽伯克霍尔德氏菌在广西地区的详细分布情况。**方法** 于2007年底对广西地区的14个地级市进行了大规模调查,共采集了77个地点的154个土壤样品和130个水样。采样通过细菌分离培养方法、16S rDNA基因测序和鞭毛基因检测的方法进行鉴定分析,对类鼻疽伯克霍尔德氏菌检出情况的地理分布进行绘图记录。**结果** 154份土壤样品中分离纯化出13株类鼻疽伯克霍尔德氏菌,阳性率为8.4%,没有在水样中发现该菌;分离纯化结果与16S rDNA基因测序和鞭毛基因检测的结果完全一致。分离纯化类鼻疽伯克霍尔德氏菌阳性的采样点分布在中东、南宁、钦州、放城、北海5个地区。**结论** 广西地区的类鼻疽伯克霍尔德氏菌主要分布在北回归线以南,南海附近地区。

[关键词] 类鼻疽;类鼻疽伯克霍尔德氏菌;16S rDNA;土壤样品
[中图法分类号] R181.81;R378.99 [文献标志码] A

Prevalence of *Burkholderia pseudomallei* in Guangxi province

Ma Guangqiang, Wang Qian, Zhu Jinhua, Ye Heping, Wan Hongjiao, Wang Jianmin (Department of Pathogen Biology and Immunology, Basic Medical College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, Jiangxi Province, 330004, China)

[**Abstract**] Objective To detect the prevalence and distribution of *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) in Guangxi province, China, Methods Samples were harvested from several locations in Guangxi region in the year of 2007. A total of 154 soil samples and 130 water samples were screened for *B. pseudomallei* by bacterial culture, and identification by PCR for species-specific 16S rDNA and flagellin genes. Results *B. pseudomallei* was detected in 8.4% of the soil samples but in none of the water samples. These results were identical with those from species-specific 16S rDNA and flagellin genes. All positive samples were confined to 5 locations including Zhongdong, Nanning, Qinzhou, Fangcheng and Beihai. Conclusion Almost all positive samples are isolated from places in the south of the Tropic of Cancer and nearby the South China Sea.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; melioidosis; 16s rDNA; soil sample

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2005AA219070). Corresponding author: Wang Jianmin, E-mail: jm_wang55@126.com

类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)是一种革兰氏阴性短杆菌,通常分布于疫原地的稻田、橡胶园、田野、耕地以及水源地附近。这种细菌可以导致东南亚和澳大利亚东北部的人和动物的潜在的急性暴发性传染病[1-2]。这种疾病有多种临床症状,主要表现为肺炎、泌尿生殖器感染、皮肤或者软组织感染、脑水肿、肝和脾脓肿以及由菌血症引起的败血性休克。其中,肺炎最常见,占所有病例的50%[3]。流行病学调查[4-5]表明,类鼻疽病例多发于南北纬20度之间的赤道地区,它是导致泰国东北部以及澳大利亚20%获得性败血症和20%~40%的菌血症死亡病例的主要原因。

在中国,香港于1983年报道了第1个人的类鼻疽病例,主要症状是肺水肿,1年以后又发现了5个病例。此外,香港于1987年在对1个结核疗养院进行类鼻疽血清学调查发现,有14%的患者(39/347)是类鼻疽阳性,这说明39个患者可能被误诊为结核;由于这些患者从来没有离开过香港,被认为是在香港接触到的*B. pseudomallei*[6]。而在大陆地区,由于对类鼻疽的不了解,直到1990年才在海南发现了第1个人的类鼻疽病例[7]。从那以后,陆续的在广东、广西和海南有了一些动物和人的类鼻疽病例报告[8-9]。从1975年至今,广西陆续从土壤和动物体内分离到*B. pseudomallei*[10],但是关于广西整个地区的*B. pseudomallei*的地理分布情况还不清楚。作为类鼻疽的疫源地之一,详细了解*B. pseudomallei*在广西的分布情况有助于该地区对该菌的预防与了解,具有十分重要的医学意义和流行病学意义。

本实验室于2007年采用细菌分离、纯化、鉴定的方法,结合特异性基因的检测和序列分析方法,对广西境内不同地区采集的水样和土壤样品进行了

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2005AA219070)
[通信作者] 汪建民,E-mail:jm_wang55@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121106.1905.018.html(2012-11-06)

*B. pseudomallei*的检测,以期了解广西境内类鼻疽伯克霍尔德氏菌的分布情况。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

2007年12月,在广西地区沿公路线进行采集,平均气温12.8 ℃。所有的14个地级市都进行了调查,总共采集了77个地点,主要是在稻田内采集。大概10 g的土壤样品从深30~60 cm的洞中采集出来,装入1个灭菌的塑料袋中。每个地点采集2个样品,2个洞之间相隔10 m。2个铲子用于样品的采集,使用前后用70%的酒精消毒灭菌处理。在有水源地的稻田附近,用灭菌的塑料离心管采集水样10 mL。总共采集了154个土壤样品和130个水样。所有的样品都保存于4 ℃的冰盒中。

1.2 分离鉴定的试剂与方法

1.2.1 材料与试剂 Ashdown液体培养基、Ashdown固体培养基、TBSS-C50选择性培养基肉汤、LB培养基、生化试剂等(杭州微生物试剂有限公司)。

1.2.2 分离、培养方法 取5 g土壤样品加入灭菌的小瓶中,加入5 mL灭菌水,剧烈震荡。取出1 mL加入9 mL的选择性培养基(TBSS-C50)肉汤中。然后42 ℃培养48 h。取1滴培养后的培养液涂到Ashdown's培养基上;42 ℃培养6 d后,观察菌落形态,有干燥、皱褶、紫色的菌落作为可疑的*B. pseudomallei*。然后将可疑菌株接入包含有15 %甘油的LB肉汤中,准备做进一步鉴定。分离的*B. pseudomallei*用生化方法[11]做进一步鉴定(表1)。

表1 生化鉴定分离株*B. pseudomallei*

采样地区	鉴定方法					
	半乳糖	麦芽糖	蔗糖	木糖	赖氨酸	精氨酸e
中东镇1	+	+	+	+	−	+
中东镇2	+	+	+	+	−	+
南宁1	+	+	+	+	−	+
南宁2	+	+	+	+	−	+
南宁3	+	+	+	+	−	+
南宁4	+	+	+	+	−	+
钦州1	+	+	+	+	−	+
钦州2	+	+	+	+	−	+
钦州3	+	+	+	+	−	+
放城1	+	+	+	+	−	+
放城2	+	+	+	+	−	+
北海1	+	+	+	+	−	+
北海2	+	+	+	+	−	+

1.2.3 数量分析 5 g土壤溶于5 mL的灭菌水中,分别取10 μL或100 μL水样分别涂布到2个Ashdown's平板上,42 ℃培养6 d。统计类似*B. pseudomallei*的细菌菌落数量,用CFU/g表达。

1.2.4 PCR鉴定 2对引物应用于对*B. pseudomallei*可疑株的鉴定:1对是特异性引物,针对类鼻疽假单胞菌鞭毛的;另1对用于扩增16S rDNA(表2)。可疑菌株的全基因组DNA用试剂盒进行提取。PCR扩增体系(25 μL)包括:DNA模板5 μL、引物1 μL、d NTP 1 μL、*Taq* 0.5 μL、10×Buffer 2.5 μL;PCR程序:94 ℃ 5 min、94 ℃ 30 s、59 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,30个循环,72 ℃ 7 min;PCR产物用1 %的琼脂糖凝胶电泳分离。用标准菌株CMCC 53001作为阳性对照。

表2 分离菌株PCR鉴定的引物

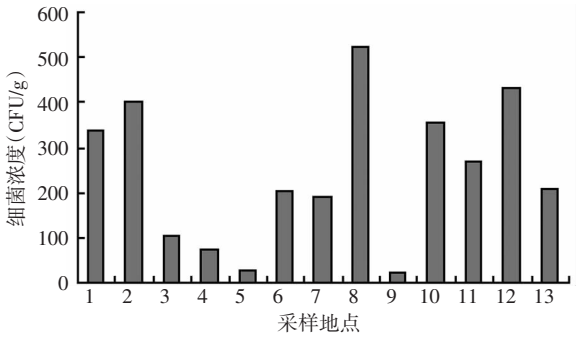
基因	引物(5′→3′)	长度(bp)
Fli C	F1 AAAAGAATTCGCGTCGGCGCTGCAACAGGAACTCG	596
	F2 AAAAAAGCTTTTACATCGCCTGGTACGCGCCCGTCTGC	
16S rDNA	F8 AGTTTGATCCTGGCTCAG	1 492
	R1492 ACCTTGTTACGACTT	

16S rDNA扩增产物用凝胶回收试剂盒回收后在上海生物工程公司测序,根据文献[12]报道,通过16S rDNA序列分析可以区分*B. mallei*、*B. tailands*和*B. pseudomallei*。通过NJ法分析所测序列有假单胞菌的同源性。生化鉴定阳性、鞭毛基因鉴定阳性与16S rDNA序列同源鉴定阳性的菌株为*B. pseudomallei*。

2 结果

2.1 *B. pseudomallei*的分离和鉴定

通过标准的分离培养方法和生化鉴定方法,从154个土壤样品中分离到了13个阳性菌株;77个采集地点有7个地点为阳性。130个水样中无一分离到*B. pseudomallei*。数据分析表明*B. pseudomallei*在阳性土壤中的浓度不同,阳性土壤中的*B. pseudomallei*含量为23~521 CFU/g(图1)。在所有的14个地级市中,崇左(中东镇)、南宁、钦州、防城、北海5个城市分离到了*B. pseudomallei*。

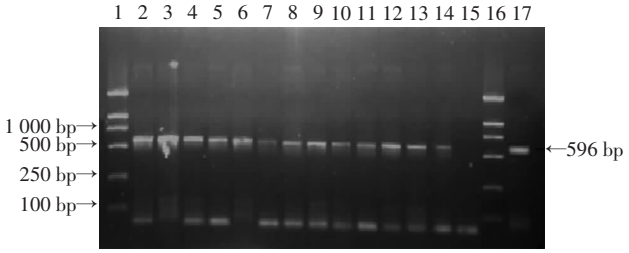


1:中东镇1;2:中东镇2;3:南宁1;4:南宁2;5:南宁3;6:南宁4;7:钦州1;8:钦州2;9:钦州3;10:防城1;11:防城2;12:北海1;13:北海2

图1 阳性样品的数量分析

2.2 分离菌株的鞭毛基因的PCR检测

利用特异性引物F1/F2,对所分离的13个可疑的*B. pseudomallei*菌株和标准菌株的鞭毛蛋白基因采用PCR技术进行了检测,结果表明:检测菌株和标准菌株都含有特异性的鞭毛蛋白基因序列(图2)。



1、16:DNA标准(DL 2 000);2~14:阳性样品检测;15、17:阴性对照

图2 PCR检测分离菌株Fli C基因

2.3 分离菌株的16s rDNA序列分析

利用16S rDNA的通用扩增引物F8/R1492扩增所有分离菌株和标准菌株的16S rDNA序列,所有待测菌株和标准菌株

的16S rDNA序列比较分析表明,所有待测菌株16S rDNA的序列与标准菌株的相关序列有99 %以上的同源性(图3),表明所有检测菌株属于 *B. pseudomallei*。这些结果与生化鉴定的结果一致。

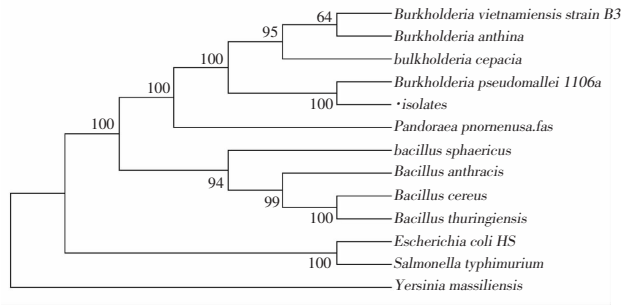


图3 根据 *B. pseudomallei* 16s rDNA 序列比对构建的 NJ 进化树

2.4 *B. pseudomallei* 的地理分布

从图4可见,*B. pseudomallei* 在广西的分布是不均匀的。所有的阳性样品采集地点都位于南宁市的南部,都位于海拔低于200 m的一片平原地带,均在北回归线以南,南海附近地区。在山区和西部、北部地区没有分离到 *B. pseudomallei*。

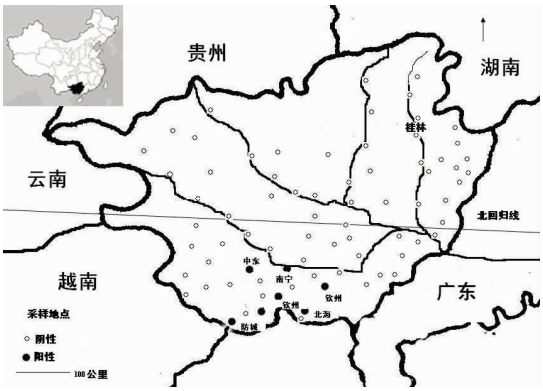


图4 广西地区采样地点分布图

3 讨论

这是中国第一次对广西全境进行的类鼻疽分布情况的调查。结果表明 *B. pseudomallei* 在广西的分布是极不平均的:在7个阳性的采集地点中,4个地点位于中国南海附近,3个位于南宁市附近。在广大的山区和广西的西部、北部没有分离到该菌。

B. pseudomallei 的分布情况是受采集的时间地点及地貌特征影响的。本研究中,13个阳性样本都采集于海拔200 m以下主要是稻米产区的平原地带。而山区没有分离到该菌,所有的130个水样也没有分离到该菌,这可能与我们采样的季节影响有关,我们是冬天采样,气温较低,不利于细菌的生长繁殖,这个结果与李俐的研究相似[12-13]。也有证据表明很多生态的因素也影响 *B. pseudomallei* 的分布,如本研究中,有11个阴性的地点位于7个阳性地点的同一个地区,甚至有1个样品就和阳性样品相隔10 m。土壤中 *B. pseudomallei* 的数量与人的类鼻疽的发病率有一定的联系。数量分析表明,广西的最高细菌含量土壤位于钦州,最低的位于南宁,细菌的数量与泰国和老挝等国家的调查结果[14]相类似。

以前对广西地区的桂林和南宁市的血清学调查[10]表明,南宁的血清类鼻疽阳性率为9.7%,桂林为1.8%。而本研究表明南宁的土壤样品阳性率为33%,桂林为0.5%,这个结果与血清学调查有一定的相关性。

类鼻疽杆菌主要存在于土壤或水中,极易获取和传播,经常接触 *B. pseudomallei* 的人容易得类鼻疽病,特别是疫原地的农民。虽然至今为止广西还没有人的类鼻疽病例发生,由于 *B. pseudomallei* 引起的肺炎容易被误诊为肺结核,所以广西的医学工作者应该对发热和肺炎病人多加关注[9]。加上该菌易培养、耐药性强,目前还没有有效的疫苗,WHO将其列为B类生物恐怖剂。因此,加强类鼻疽研究具有重要的社会意义和军事价值[2]。

参考文献:

[1] Cheng A C, Currie B J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 383-416.
[2] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317.
[3] Dance D A. Melioidosis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2002, 15(2): 127-132.
[4] Currie B J, Fisher D A, Howard D M, *et al*. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature[J]. Clin Infect Dis, 2000, 31(4): 981-986.
[5] Wiersinga W J, van-der-Poll T, White N J, *et al*. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(4): 272-282.
[6] So S Y, Chau P Y, Aquinas M, *et al*. Melioidosis: a serological survey in a tuberculosis sanatorium in Hong Kong[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987, 81(6): 1017-1019.
[7] 李俐, 韩藕儿, 赵忠利, 等. 海南岛人群类鼻疽血清学调查及该地首例病人发现的报告[J]. 中国人兽共患病杂志, 1990, 6(5): 38-39.
[8] 方瑶, 顾江, 王海光, 等. 抗类鼻疽伯克霍尔德菌多抗血清的制备及评价[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(3): 292-294, 296.
[9] 陈金堂, 程宏宁, 莫成锦. 类鼻疽病误诊肺结核病6例分析[J]. 山东医药, 2009, 49(41): 103-104.
[10] Yang S. Melioidosis research in China[J]. Acta Trop, 2000, 77(2): 157-165.
[11] Ashdown L R. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in the clinical laboratory[J]. J Clin Pathol, 1979, 32(5): 500-504.
[12] 李俐, 陆振豸, 韩藕儿, 等. 我国类鼻疽流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志, 1994, 15(5): 292-295.
[13] Yang S, Tong S, Lu Z. Geographical distribution of *Pseudomonas pseudomallei* in China[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1995, 26(4): 636-638.
[14] Suputtamongkol Y, Chaowagul W, Chetchotisakd P, *et al*. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis[J]. Clin Infect Dis, 1999, 29(2): 408-413

(**收稿**:2012-09-08;**修回**:2012-10-24)
(编辑 邓强庭)