

· 现场调查 ·

中国六省致病小肠结肠炎耶尔森菌的脉冲场凝胶电泳分析

金东 崔志刚 肖玉春 王鑫 顾锋 夏胜利 胡万富 杨晋川 汪华
顾玲 徐建国 阙飙 景怀琦

【摘要】 目的 对中国致病小肠结肠炎耶尔森菌分离株进行脉冲场凝胶电泳分析。方法 参照美国疾病预防控制中心 PulseNet 实验方法对中国 6 省 165 株致病小肠结肠炎耶尔森菌进行脉冲场凝胶电泳分析,使用 BioNumerics 软件进行聚类分析,并按照 PulseNet 命名原则对带型进行命名。结果 将 114 株 O:3 血清型小肠结肠炎耶尔森菌分成 25 个带型;K6GN11C30012(50 株)、K6GN11C30015(19 株)及 K6GN11C30016(10 株)是其主要带型,三个主要带型之间聚类相似性很高。将 51 株 O:9 血清型小肠结肠炎耶尔森菌分为 14 个带型;其中 K6GN11C90004(22 株)与 K6GN11C90010(13 株)是其主要带型,K6GN11C90004 与 K6GN11C90010 带型之间有一定的差异。O:3 与 O:9 血清型的主要带型之间有明显的差异。结论 O:3 血清型的小肠结肠炎耶尔森菌可能起源于一个克隆系,且在不同地区和年代变异很小;O:9 血清型的小肠结肠炎耶尔森菌可能起源于两个不同的克隆系,且各自有一定的变异。O:3 与 O:9 血清型的小肠结肠炎耶尔森菌亲缘关系较远。

【关键词】 小肠结肠炎耶尔森菌;脉冲场凝胶电泳;分子分型

Molecular typing of the pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains with pulsed field gel electrophoresis isolated in China JIN Dong*, CUI Zhi-gang, XIAO Yu-chun, WANG Xin, GU Feng, XIA Sheng-li, HU Wan-fu, YANG Jin-chuan, WANG Hua, GU Ling, XU Jian-guo, KAN Biao, JING Huai-qi.
*National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: XU Jian-guo, Email: xujg@public. bta. com. cn; JING Huai-qi, Email: jinghuaiqi@icdc. cn; KAN Biao, Email: kanbiao@icdc. cn

【Abstract】 Objective To investigate the epidemiological and molecular typing features of the pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains isolated in China, using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and standardized PFGE method as well as typing database of *Yersinia enterocolitica*. **Methods** PFGE analysis was performed as Laboratory Directions for molecular subtyping of *Salmonella* by PFGE (PulseNet, USA) with some modifications and the results of PFGE were analyzed by BioNumerics soft (Version 4.0, Applied Maths BVBA, Belgium). **Results** 114 O:3 *Yersinia enterocolitica* strains were typed by 25 patterns to have found that K6GN11C30012(50 strains), K6GN11C30015(19 strains) and K6GN11C30016(10 strains) were the major patterns. K6GN11C30012 had 92.2% cluster similarity with K6GN11C30009-K6GN11C30023. This clone included 91.23% strains of 114 O:3 *Yersinia enterocolitica* strains. 51 O:9 *Yersinia enterocolitica* strains were typed by 14 patterns; K6GN11C90004 (22 strains) and K6GN11C90010 (13 strains) were the major patterns. K6GN11C90004 had 81.8% cluster similarity with K6GN11C90010 patterns. The major patterns of O:3 and O:9 serotypes were quite different. **Conclusion** O:3 *Yersinia enterocolitica* strains might originate from the same clone and had very few variation in different years and provinces but O:9 *Yersinia enterocolitica* strains from two different clones with some changes.

【Key words】 *Yersinia enterocolitica*; Pulsed field gel electrophoresis; Molecular typing

作者单位:国家“十五”科技攻关计划资助项目(2003BA712A05-04)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(金东、崔志刚、肖玉春、王鑫、徐建国、阙飙、景怀琦);吉林省地方病第一防治研究所(顾锋);河南省疾病预防控制中心(夏胜利);安徽省疾病预防控制中心(胡万富);江苏省徐州市疾病预防控制中心(杨晋川);江苏省疾病预防控制中心(汪华、顾玲)

金东、崔志刚、肖玉春同为第一作者

通讯作者:徐建国, Email: xujg@public. bta. com. cn; 阙飙, Email: kanbiao@icdc. cn; 景怀琦, Email: jinghuaiqi@icdc. cn

目前用于小肠结肠炎耶尔森菌的分子分型方法包括质粒酶切图谱分析、随机扩增多态性分析(RAPD)、限制性片段长度多态性分析(RFLP)等^[1,2]。与其他分子生物学分型技术相比,脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术具有可重复性强、结果稳定可靠、区分能力强等优点^[3,4]。美国疾病预防控制中心(CDC)和公共卫生实验室协会(APHL)在美国联合各州级实验室以 PFGE 技术为核心组建了 PulseNet 网络,该网络在控制细菌性传染病的爆发性流行中发挥了重要作用^[5]。我国由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所牵头于 2003 年正式加入 PulseNet,并建立了 PulseNet China 中心实验室。小肠结肠炎耶尔森菌血清型众多,但仅有少数几个血清型别具有致病性。通过对近 10 年来我国各地从动物或人分离到的 600 多株小肠结肠炎耶尔森菌株的毒力基因分析证实,到目前为止所有致病的小肠结肠炎耶尔森菌均属于 O:3 和 O:9 血清型^[6]。本实验参考美国 CDC PulseNet 实验方法,探索并建立了小肠结肠炎耶尔森菌的 PFGE 分型方法,对我国致病小肠结肠炎耶尔森菌进行分析,以了解其分子流行病学特征和遗传变异关系,同时建立数据库,为以后小肠结肠炎耶尔森菌病的监测工作打下基础。

材料与方 法

1. 实验材料:

(1) 实验用菌株:1985 - 2004 年福建、河南、宁夏、江苏、吉林、安徽以及浙江 6 省份分离到的致病血清型小肠结肠炎耶尔森菌 165 株,其中 O:3 血清型 114 株;O:9 血清型 51 株。所有菌株均经过血清学、生化鉴定及毒力基因分析^[6]。其中参考菌株 52203(O:3 血清型)和 52212(O:9 血清型)由法国巴斯德研究所提供;Pa134、Pa2346、Pa2369、Pa40314、y4/03 和 y3vp5/03(O:3 血清型)以及 ji O:9 和 SA98-233(O:9 血清型)由日本博导博教授提供。O:3 血清型小肠结肠炎耶尔森菌主要分离自福建(55 株)和吉林(49 株)省;其中 7 株分离自患者标本,其他均分离自动物宿主,菌株主要分离自猪,共计 86 株。O:9 血清型小肠结肠炎耶尔森菌主要分离自河南省(17 株)和吉林省(17 株),其中 8 株分离自患者,其他菌株主要分离自动物宿主,其中 26 株分离自猪。

(2) 主要试剂和耗材:限制性内切酶 Not I、Xba I 购自 Promega 公司;SeaKem Gold 琼脂糖购自 Cambraex Bio Science Rockland 公司;蛋白酶 K 购自

Merck 公司;SDS 为北京鼎国生物技术发展中心进口分装;EDTA、Tris 及硼酸购自上海生工生物工程技术服务有限公司;十二烷基肌氨酸钠购自 SIGMA 公司;其他相关试剂购自北京化工厂,试剂均为分析纯。小肠结肠炎耶尔森菌分型血清购自日本生研株氏会社。比浊用试管为 REF352054(美国 BD 公司);50 ml Screw-cap 试管为 Corning Centrifuge Tube(美国 Corning 公司)。

(3) 主要仪器:脉冲场凝胶电泳仪为 CHEF MAPPER System(美国 Bio-Rad 公司);凝胶成像系统为 GEL Doc 2000(美国 Bio-Rad 公司);水浴摇床为 Grant OLS2000(英国 Grant 公司);浊度仪为 Densimat(法国 BioMérieux Vitek 公司)。

2. 实验方法:

(1) PFGE:参照美国 CDC 的 PulseNet 实验手册。①制作胶块:挑取单个菌落接种于胰蛋白大豆肉汤琼脂培养基上,28℃ 培养 36 h。刮取适量细菌,调整其麦氏比浊值至 4.0。取 400 μ l 细菌悬浊液 37℃ 孵育 5 min 后加入 20 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)。将菌悬液与 400 μ l 1% Seakem Gold:1% SDS 混匀后加入模具,在室温下凝固 10 - 15 min 后制成胶块。将胶块移入 5 ml 细胞裂解液[50 mmol/L Tris(pH 值 8.0),50 mmol/L EDTA(pH 值 8.0),1% 十二烷基肌氨酸钠,0.1 mg/ml 蛋白酶]中,54℃ 水浴摇床(转速约 130 r/min)中孵育 2 h。使用纯水于 50℃ 水浴摇床中清洗 2 次,每次 10 min(转速不变);然后使用 Tris:EDTA buffer [10 mmol/L Tris (pH 值 8.0),1 mmol/L EDTA(pH 值 8.0)]在 50℃ 的水浴摇床中清洗 4 次,每次 15 min。②酶切:切取 2 mm 宽的胶块,用 150 μ l 酶切缓冲液 37℃ 缓冲 10 - 15 min。重新加入酶切缓冲液和适量的限制性内切酶共 200 μ l,每个样本酶的用量:Xba I 40 U,Not I 30 U。37℃ 孵育 2 h。吸出酶切液,加入 200 μ l 0.5 \times TBE,将胶块加在梳子齿上,干燥约 5 min 后,倒入平衡好的 1% SKG,室温凝固 30 min。③电泳:电泳条件:2000 ~ 2200 ml 0.5 \times TBE,电压 6.0 V/cm,脉冲夹角 120°,起始脉冲时间 2 s,终止脉冲时间 20 s,电泳时间 18 h。④图像获取:完成电泳后,将胶放入 1 μ g/ml 溴化乙啶染色 30 min,置纯水中脱色 30 min,读胶仪中成像。

(2) 电泳图像分析和结果聚类分析:PFGE 图像应用 BioNumerics(Version 4.0)数据库软件(Applied Maths BVBA,Belium)进行处理,识别图像条带。在

图像识别过程中,在 Marker 最小片段外的实验菌株条带因为不能为 Marker 校准而被舍去。图像通过统一的 Marker 进行校准,标定条带位置,必要时进行人工校正。聚类方法和参数选择:聚类图类型(dendrogram type)选择 UPGMA(Unweighted Pair group Method using Arithmetic averages)方法,条带位置差异容许度(position tolerance)选择 1.0%,优化值(optimization)0.5%。Band based/Dice 方法计算相似性系数(similarity coefficient),即 Dice 系数($F \times 100\%$, $F \text{ value} \times 100\%$)。 $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, n_x 是菌株 x 的总的片段数, n_y 是菌株 y 的总的片段数, n_{xy} 是菌株 x 和菌株 y 的相同的片段数, F 值反映的是不同菌株电泳条带的相似性程度,范围在 0~1 之间,0 代表完全不相关,1 代表完全相同。按照 PulseNet 的命名原则,对每一种不同的带型进行命名。在 PulseNet 带型命名规则中,前三位大写字母 K6G 表示小肠结肠炎耶尔森菌, N11 表示内切酶 Not I,后面的 C 表示是中国分离株的分析带型,最后是带型的依次编号。

结果

本研究中获得 O:3 血清型的小肠结肠炎耶尔森菌的带型,我们依次命名为 K6GN11C30001 到 K6GN11C30027,为叙述方便,在正文中将带型命名的 K6GN11 略去,缩写为后 6 位字母和数字,以下 O:9 血清型菌株带型名称缩写类推。O:3 血清型小肠结肠炎耶尔森菌分离株的带型及聚类关系如图 1。C30012(50 株)、C30015(19 株)以及 C30016(10 株)是 O:3 菌株的主要型别;C30012 与 C30009 至 C30023 带型的聚类相似性为 92.2%,这一克隆的菌株占总数的 91.23%。参考菌株 52203 的带型与 C30025 带型完全相同,其带型与日本参考菌株的聚类相似性较高,但是与我国主要克隆系之间的聚类相似性仅有 85.2%。

O:9 血清型的小肠结肠炎耶尔森菌命名为 K6GN11C90001 到 K6GN11C90019(后面带型缩写同 O:3 血清型菌株)带型及聚类关系如图 2。其中 C90004 包括 22 株 O:9 血清型的小肠结肠炎耶尔森;C90010 型包括 13 株 O:9 血清型的小肠结肠炎耶尔森,这两种带型是 O:9 血清型的小肠结肠炎耶尔森菌株的主要带型。C90004 带型与 C90002 和 C90003 带型的聚类相似性超过了 96.6%,这一克隆的菌株占菌株总数的 50.98%。C90010 带型与

C90008 和 C90009 带型的聚类相似性达到了 96%,这个克隆系占菌株总数的 33.33%。C90006 与 C90012 带型聚类相似性为 81.8%。其中参考菌株 52212 与 C90006 带型聚类相似性为 91.3%。日本的参考菌株 SA98-233 与 C90010 带型相同。

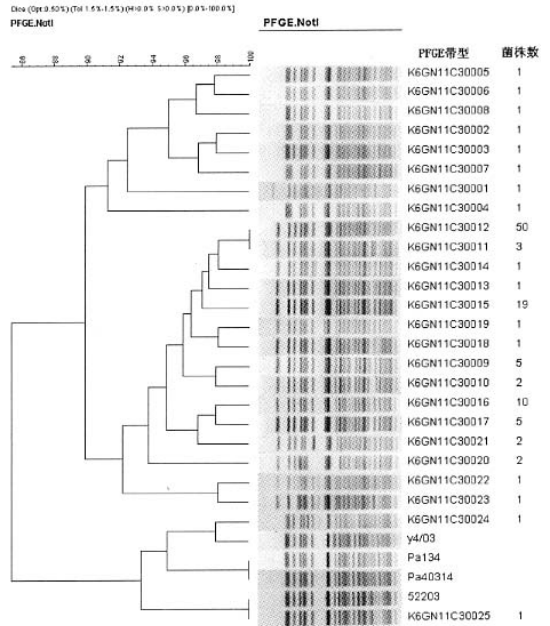


图1 我国 6 省份 114 株 O:3 血清型小肠结肠炎耶尔森菌分离株带型聚类图(对参考菌株没有进行我国分离株带型的统一命名)

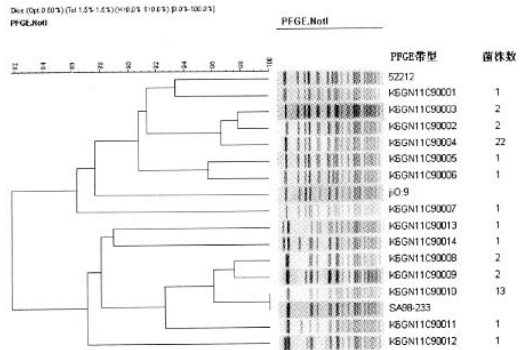


图2 我国 6 省份 51 株 O:9 血清型小肠结肠炎耶尔森菌分离株带型聚类图(参考菌株没有进行我国分离株带型的统一编号)

讨论

现已证实小肠结肠炎耶尔森菌广泛分布于自然界,动物是小肠结肠炎耶尔森菌的重要宿主,几乎所有家畜中都曾发现小肠结肠炎耶尔森菌的自然感

染,对人群构成严重威胁。小肠结肠炎耶尔森菌血清型众多,不同国家和地区的致病菌株的血清型存在明显差异。美国以O:8占优势,其次是O:5,27血清型;比利时的菌株以O:3为主,其次是O:9血清型;日本则以O:3为主,其次为O:6血清型^[7]。通过对我国分离的600多株小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因分析证明,致病的小肠结肠炎耶尔森菌均属于O:3和O:9血清型。在国外分离的O:8血清型菌株具有很强的毒力,而我国目前分离到的O:8血清型菌株均缺乏毒力因子;通过对O:8血清型小肠结肠炎耶尔森菌 PFGE 分析证实其带型差异明显,且无明确的流行病学意义^[8]。PFGE 方法由于其自身的优点而被广泛应用于细菌的分型研究,但是目前国内还没有使用 PFGE 方法对小肠结肠炎耶尔森菌进行分析的先例。

C30012 带型是我国O:3血清型小肠结肠炎耶尔森菌的主要型别,这带型与 C30009、C30010 等多个带型的聚类相似性都很高,这一克隆包括了我国多个省份不同年代的104株O:3血清型小肠结肠炎耶尔森菌,占菌株总数的91.23%,是我国O:3血清型小肠结肠炎耶尔森菌的主要克隆系。这一克隆系内虽然有一定的变化但是其变化很小,这说明分离自不同地区和不同年代的O:3血清型小肠结肠炎耶尔森菌的变异很小。标准菌株52203与我国主要带型之间聚类相似性差异较大,但是与安徽省2004年患者中分离的菌株(C30025带型)有相同的带型。

在O:3血清型小肠结肠炎耶尔森菌聚类分析图中两个不同的带型 C30011 和 C30012 的聚类相似性为100%,这是因为在应用 BioNumerics 软件对 PFGE 图像中的条带进行识别的时候,为了保证大多数的条带得到较好的识别而对软件的相关参数进行了一定设定,这一设定在保证了绝大多数的条带得到识别的同时也可能造成对图像中某些细微差别的识别不清。为了解决这一问题需要在进行图像分析时对所有的 PFGE 图像进行肉眼识别,特别是对那些聚类相似性为100%的带型。本实验中通过肉眼校正发现带型 C30011 与 C30012 之间存在着差别,故将其分成两个不同的带型。

C90004 以及 C90010 带型是O:9血清型小肠结肠炎耶尔森菌的主要型别。C90004 与 C90002 和 C90003 属于同一克隆系,C90010 与 C90008 和 C90009 为同一克隆系,这两个克隆系系内差异较

小,而系间差异较大。这说明我国的O:9血清型小肠结肠炎耶尔森菌可能来源于两个不同的克隆系。标准菌株52212与C90004带型的聚类相似性较高,但是与C90010的差异明显。值得一提的是分离自日本动物宿主中的一株O:9血清型小肠结肠炎耶尔森菌与C90010带型完全相同。

C30012 带型与 C90004 以及 C90010 差异明显,说明O:3与O:9血清型小肠结肠炎耶尔森菌之间亲缘关系较远。

小肠结肠炎耶尔森菌的血清型别众多,目前国内分离的致病小肠结肠炎耶尔森菌均为O:3和O:9血清型,但是不能排除其他血清型别致病的可能性。我们曾经对国内分离到的O:8血清型小肠结肠炎耶尔森菌进行 PFGE 分析,其聚类差异明显^[8]。本实验结果证明致病性小肠结肠炎耶尔森菌同一血清型之间的带型聚类相似性很高。

另外,通过本研究,我们建立了我国小肠结肠炎耶尔森菌分离株的 PFGE 分析数据库,进行了规范的带型命名。本工作将进一步建立起全国的小肠结肠炎耶尔森菌实验室监测平台。

参 考 文 献

- 1 赵阳青,景怀琦,徐建国,等. 小肠结肠炎耶尔森氏菌的质粒图谱及 REAP 的分析. 疾病监测,1999,14:5-7.
- 2 赵阳青,景怀琦,徐建国,等. 小肠结肠炎耶尔森氏菌的随机扩增多态性 DNA 的分析. 中国人兽共患病杂志,1998,14(5):10-13.
- 3 Bohm H, Karch H. DNA fingerprinting of *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 1992, 30: 2169-2172.
- 4 Soldati L, Piffaretti JC. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. Res Microbiol, 1991, 142: 489-498.
- 5 Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis, 2001, 7: 382-389.
- 6 景怀琦,李继耀,肖玉春,等. O:3 和 O:9 小肠结肠炎耶尔森菌主要毒力基因分布调查. 中国媒介生物学及控制杂志, 2004, 15: 317-319.
- 7 Rasmussen HN, Olsen JE, Rasmussen OF. RAPD analysis of *Yersinia enterocolitica*. Letters Applied Microbiol, 1994, 19: 359-362.
- 8 顾玲,汪华,朱凤才,等. 江苏省南通地区小肠结肠炎耶尔森菌分布特征初步研究. 中华流行病学杂志, 2005, 26: 786-789.

(收稿日期:2006-01-26)

(本文编辑:张林东)