

· 实验室研究 ·

中国嗜肺军团菌分离株脉冲场凝胶电泳分型分析以及数据库的建立

秦天 任红宇 周海健 朱兵清 崔志刚 邵祝军

【摘要】 目的 对分离的 262 株嗜肺军团菌进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析,初步建立中国嗜肺军团菌的 PFGE 分型数据库。方法 采用 PFGE 技术,对 2004—2009 年中国 11 个省(市)分离的嗜肺军团菌用 *Asc I* 酶切, BioNumerics 软件分析 PFGE 图谱,并建立分子分型数据库。结果 262 株嗜肺军团菌的 PFGE 图谱共分为 108 种不同的 PFGE 带型,相似性系数在 16%~100% 之间,通过聚类分析,可以分为差异明显的不同簇。不同省份、年份和血清型的菌株之间有交叉带型。结论 中国环境分离的嗜肺军团菌菌株基因组变异较大,同时也具有克隆化特征,且可能有多个克隆系存在。

【关键词】 嗜肺军团菌;脉冲场凝胶电泳;监测网络,中国病原细菌实验室

Molecular typing of *Legionella pneumophila* isolates from China with pulsed field gel electrophoresis QIN Tian, REN Hong-yu, ZHOU Hai-jian, ZHU Bing-qing, CUI Zhi-gang, SHAO Zhu-jun. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention and State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Support Projects for the "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2008ZX10004-007).

【Abstract】 **Objective** To analyze the molecular types of *Legionella (L.) pneumophila* strains isolated in China, and to develop the PulseNet-China Database of *L. pneumophila*. **Methods** Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used to analyze 262 *L. pneumophila* strains collected from 11 provinces between 2004 and 2009 in China. Different kinds of genomic DNA in different *L. pneumophila* strains were isolated and separated after digesting with *Asc I*. BioNumerics software was used to analysis the PFGE fingerprints. **Results** *L. pneumophila* strains isolated in China were quite different regarding their PFGE patterns. There were 108 PFGE types among the 262 strains tested in this study. The similarity value of these strains was in the range of 16%–100% and the same types were discovered in different provinces and years. **Conclusion** *L. pneumophila* strains isolated in China were with high genetic variations. There might be different clones existed in China. The development of PulseNet China Database was thus of great significance in monitoring the *L. pneumophila* strains in the future.

【Key words】 *Legionella pneumophila*; Pulsed field gel electrophoresis; PulseNet China

近年来随着微生物基因组数据的积累以及分析技术的快速发展,以核酸序列差异分析为主的分子分型方法逐步建立并趋成熟,在揭示细菌性传染病的流行规律方面显示了其很好的适用性。在众多的细菌分子分型方法中,脉冲场凝胶电泳(PFGE)以其

分辨率高、重复性好、结果稳定可靠等优点而被广泛使用。由于 PFGE 是选用全基因组 DNA,在统一设定内切酶和实验条件下,产生的结果可重复性好,且不同实验室的结果具有可比性,而优于其他分子分型方法^[1,2]。中国疾病预防控制中心(CDC)于 2004 年建立了以 PFGE 技术为核心的国家病原细菌实验室监测网络——PulseNet China,确定了多种细菌的 PFGE 标准实验方案,其中包括嗜肺军团菌。本研究应用标准化的 PFGE 分子分型方案,对我国 2004—2009 年 11 个省(市)分离的 262 株嗜肺军团菌进行 PFGE 分型,以了解环境水样分离的嗜肺军团菌的分

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.03.019

基金项目:“十一五”国家科技重大专项(2008ZX10004-007)

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

秦天、任红宇同为第一作者

通信作者:邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

子分型特征,并建立嗜肺军团菌 PulseNet 数据库,为该菌的分子水平监测提供依据。

材料与方法

1. 实验菌株:随机选取中国 CDC 传染病预防控制所呼吸道传染病室(本实验室)保存的从我国 11 个省(市)2004—2009 年分离的 262 株嗜肺军团菌(表 1)。所有菌株均来自公共场所军团菌常规监测,分离自不同的水样标本,包括冷却塔水、中央空调水、温泉水、公共场所和家庭管道水。所有菌株均经本实验室生化和血清学鉴定为嗜肺军团菌。沙门菌 *Braenderup* 血清型菌株 H9812 作为 PFGE 分子质量标准^[3]。

表 1 2004—2009 年我国 11 个地区嗜肺军团菌分离菌株分布

年份	安徽	北京	广东	广西	河北	江西	内蒙古	宁夏	上海	浙江	重庆	合计
2004	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	4
2005	-	37	20	-	-	-	-	-	-	-	4	61
2006	3	8	-	2	-	-	-	4	-	14	-	31
2007	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	9
2008	-	-	-	-	27	7	4	-	64	-	-	102
2009	-	-	-	-	-	-	-	-	55	-	-	55
合计	3	47	22	2	27	7	4	13	119	14	4	262

2. PFGE 方法:参照 PulseNet 细菌 PFGE 分型标准化方案建立嗜肺军团菌 PFGE 分型标准化方案^[4],即用 bioMérieux DENSIMAT 比浊仪调整细菌悬液浓度($A=3.8 \sim 4.0$),加入 1% Seakem Gold:1% SDS 胶,混匀制备胶块。使用含蛋白酶 K 的细胞裂解液(CLB)消化 2 h。纯水清洗胶块 2 次,TE(10 mmol/L Tris:1 mmol/L EDTA, pH 值 8.0)清洗胶块 4 次。使用 20 U Asc I (New England Biolabs, 美国)内切酶进行酶切,在 37 °C 孵育 4 h。在 CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories, 美国)电泳仪中进行脉冲场电泳。电泳参数为 6.8 ~ 54.2 s, 19 h。电泳结束后,使用溴化乙锭(EB)染色。在读胶仪中成像,并转换成 TIFF 图像格式保存。

3. 数据分析:PFGE 图像录入 BioNumerics (Version 5.1, Applied maths, Inc.) 软件进行处理,识别图像条带,经统一的分子质量标准进行校准,标定条带位置,必要时进行手工校正, <20.5 kb 的条带忽略不计。每两个图像之间的相似性系数用 Dice 系数(Dice coefficients, S_D)表示^[5]。 $S_D = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$,其中 n_x 是菌株 x 的总条带数, n_y 是菌株 y 的总条带数, n_{xy} 是菌株 x 和菌株 y 共有的条带数。 S_D 值反映不同菌株 PFGE 图像之间的相似性程度,范围在 0 ~

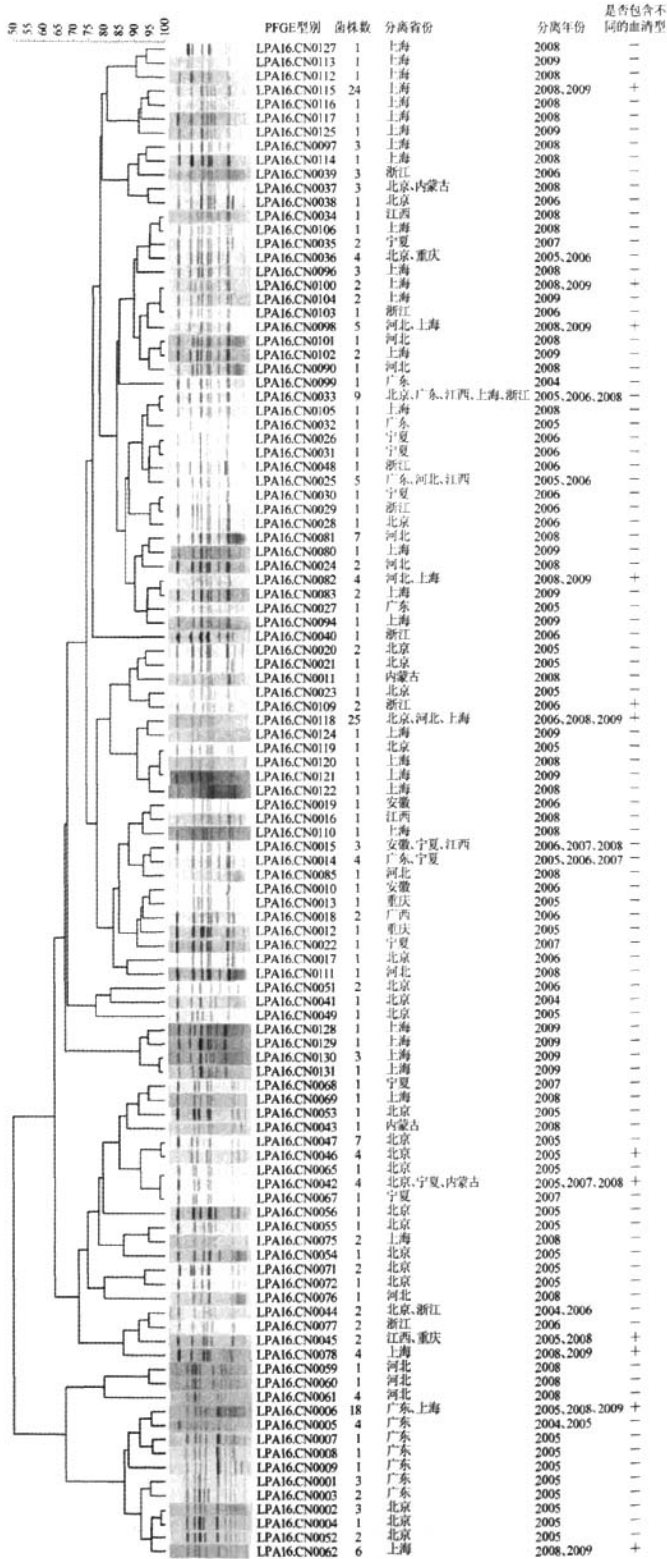
1 之间(0 代表完全不一样,1 代表完全相同)。出现不同条带即判定为不同的型别,对每一个型别均进行命名。根据每两个图像之间的相似性系数,用非加权配对算术平均法(unweighted pair group average method, UPGMA)进行聚类,并构建聚类树。

结 果

1. 嗜肺军团菌 PFGE 分型:对 262 株嗜肺军团菌进行酶切电泳后可得到 25 ~ 1100 kb 大小的电泳片段,不同菌株条带数在 9 ~ 13 条之间(图 1)。根据相似度 100% 为同一 PFGE 型别的原则,262 株菌分为 108 种不同带型,其相似性系数为 16% ~ 100%。每种带型包含菌株数为 1 ~ 25 株不等,其中 66 种带型(61.11%)分别只包含 1 株菌,其他 42 种带型包含菌株数均在 1 株以上。有 13 种带型包含来自不同省(市)的菌株,其中带型 LPA16.CN0033 出现的省(市)最多,在北京、广东、江西、上海和浙江 5 个省(市)均发现 LPA16.CN0033 带型菌株;有 95 种(87.96%)带型只局限在某一个省份。有 18 种带型在不同年份出现,另 90 种带型属于某个年份的独有带型。带型 LPA16.CN0006 出现的年份跨度最大(2005—2009 年),其次是 LPA16.CN0033(2005—2008 年)、LPA16.CN0037(2005—2008 年)、LPA16.CN0042(2005—2008 年)、LPA16.CN0118(2006—2009 年)和 LPA16.CN0014(2005—2007 年)。有 12 种带型包含多种血清型菌株,如 LPA16.CN0118(4 种血清型)、LPA16.CN0006(3 种血清型)和 LPA16.CN0115(3 种血清型)等。在 42 种带型相同的菌株中,有 57.14%(24/42)分离自相同的省份和年份。将 108 个 PFGE 图谱进行聚类分析,可以分为明显的 2 个簇,带型总体相似度为 49.91%。两簇的带型在条带分布上有明显差异,如 A 簇内的带型均含有 1100 kb 和 310 kb 大小的片段, B 簇内的带型均含有 700 kb 和 180 kb 大小的片段。

由于分析菌株中分离自上海地区的菌株较多(共计分离 119 株,其中 2008 年 64 株和 2009 年 55 株),本研究对这些菌株进行单独 PFGE 分析。119 株菌分为 36 个 PFGE 型,其中有 7 个型别在 2008 和 2009 年均出现。上海地区出现的 PFGE 带型中有 5 个也出现在其他省(市),包括 LPA16.CN0006(广东)、LPA16.CN0033(北京、广东、江西)、LPA16.CN0082(河北)、LPA16.CN0098(河北)和 LPA16.CN0118(北京、河北)。

此外对北京地区分离的 47 株菌也单独进行



注:图谱之间的相似性系数用距离法(Dice系数)计算,聚类树构建方法为非加权配对算术平均法(UPGMA);+,包含不同血清型菌株,-:不包含不同血清型菌株

图1 2004—2009年我国11个省(市)分离262株嗜肺军团菌的108个PFGE带型聚类分析

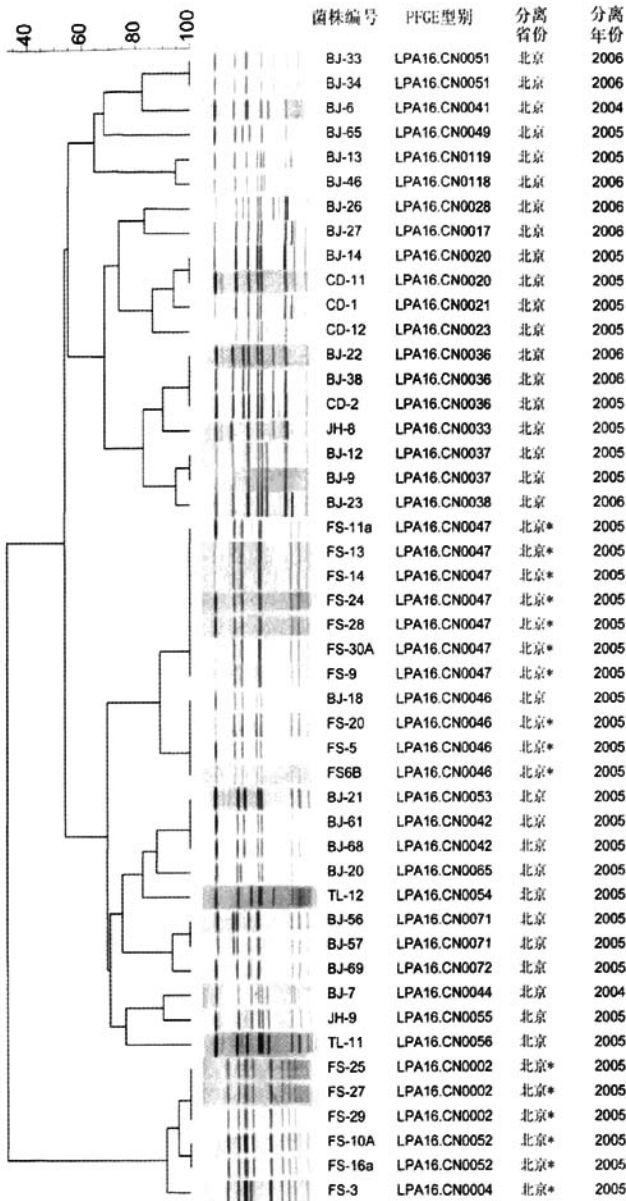
PFGE分析(图2)。47株菌分为29个不同的PFGE型。其中有14株菌分离自从一个度假村采集的温泉水水样。这14株菌分为4个带型,每个型别平均包含3.5株菌;其他33株菌分离地点较分散,来自不同的水体,分为26个型别,每个型别平均包含1.3株菌,菌株多态性明显大于同一水环境分离的菌株。

2. 嗜肺军团菌PFGE分型数据库的建立:在PFGE电泳图谱中,每一条泳道代表1株菌。细菌染色体通过酶切、电泳后,不同菌株呈现不同条带数目和分布,即不同的电泳图像。电泳图像录入BioNumerics软件,经过统一的分子质量标准进行归一化,将条带数目和分布相同的菌株归为同一个PFGE型别。本数据库中的菌株带型均按照PulseNet的带型命名原则命名。命名格式为LPA16.CNX,其中LP代表嗜肺军团菌,A16为限制性内切酶Asc I的代码,CN代表菌株分离国家为中国,X为带型编号,一般以四位数字表示。每次录入菌株图谱后立即对带型进行命名,且同时录入菌株信息。必须录入的菌株信息有分离时间、分离地点、来源和血清型。

2005年从广东省分离的3株PFGE带型相同的嗜肺军团菌为首批录入数据库,按照带型命名原则,其带型编号为LPA16.CN0001;随后录入了从北京市分离的3株PFGE带型相同的菌株,按照命名原则,其带型编号为LPA16.CN0002。之后每批录入新的图谱时,如果与数据库中已有图谱一样,即给予与原有带型相同的编号;如果新录入图谱与数据库中已有图谱均不一致,则给予新的编号。例如在录入2008年从河北省分离的25株嗜肺军团菌分为13个PFGE型,在录入PFGE图谱和进行带型命名时,其中4株菌的带型与数据库原有带型一致,按原有带型命名分别为LPA16.CN0118、LPA16.CN0098、LPA16.CN0025和LPA16.CN0082;其他21株菌分为9个带型,分别给予新的带型编号。

讨论

军团菌感染引起军团菌病,以小范围



注:构建方法同图1; *为同一时间从同一个度假村分离的菌株

图2 北京地区分离的47株嗜肺军团菌PFGE聚类分析

暴发和散发病例为主,多见于院内感染、社区感染和旅行相关性感染^[6,7]。军团菌病是一种全球性疾病,会随着旅行者传播,所以需要多个地区的实验室相互交流信息(病原菌监测网络化)才能揭示菌株间的关系。而监测网络化的前提是实验方法的一致性。在以前的研究中,本实验室已对嗜肺军团菌的PFGE实验方法进行了优化,且对PFGE用于嗜肺军团菌分型的分辨率、重复性、流行病学一致性及其与其他分型方法的分型结果一致性进行了评价,确定了适用的内切酶以及电泳条件^[4]。该实验方法经多个实

实验室使用^[8,9],显示有较好的实用性,从而确定为PulseNet China嗜肺军团菌PFGE标准化实验方案。本研究应用该方法对2004—2009年我国11个省(市)分离的262株嗜肺军团菌进行PFGE分析,结果显示嗜肺军团菌PFGE型别多态性大,充分体现了该菌的基因多态性。同时,在同一地区和同一水系中,又存在带型相同的菌株,说明嗜肺军团菌存在基因多态性的同时也具有一定的遗传稳定性。另外,某些属于不同血清型的嗜肺军团菌具有相同的PFGE带型,表明不同血清型嗜肺军团菌基因组结构一样或者非常相似。

聚类结果能够将本研究的262株菌108个型别分成图谱差异比较大的不同类别,提示我国的嗜肺军团菌具有克隆化特征,且是多个克隆系并存。在带型分布上,各地区分离的菌株既具有相同和相似的带型,也存在差异较大的带型,表明嗜肺军团菌的基因型不具有地域性分布特征;许多相同或相似的带型出现在不同的年份,表明同一个嗜肺军团菌克隆可以存在多年,带型可以跨年份分布。有研究表明,一个优势克隆系的菌株可以在某一个水系里长期存在达17年^[10]。所以,对环境菌株分子型别的研究,需要长期监测,收集大量的菌株进行分子水平的检测,以揭示环境嗜肺军团菌分子型别在时间序列上的分布和变化趋势。

当前传染病预防控制面临的一个重要问题是传染病迅速地跨越地区传播。一些病原体的远距离传播导致爆发性流行或散发,相互间很难通过疫情数字联系起来,必须通过细致的流行病学调查以及对病原体监测分析才能揭示内在的联系。所以对病原体的检测应形成网络化,以结合流行病学信息,在发现新发传染病、确定暴发及其扩散范围、寻找传播来源和传播链等方面发挥重要作用。2004年PulseNet China正式加入了PulseNet网络,并开始建立PFGE标准化方案和数据库。本研究依据PulseNet China的要求和规则,选择近6年从我国各地区分离的嗜肺军团菌,建立了PFGE分型标准数据库。通过数据库比对,揭示了我国环境分离嗜肺军团菌PFGE型别分布特征。本数据库将随着PulseNet China各网络实验室工作的开展,在数据扩

充的同时,供各实验室查询、比对图谱,为分析嗜肺军团菌暴发和流行原因、散发病例分离菌株之间以及病例菌株与环境菌株间的关系提供实验室数据支持。

参 考 文 献

- [1] Cooper KL, Luey CK, Bird M, et al. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. Foodborne Pathog Dis, 2006,3(1):51-58.
- [2] Kam KM, Luey CK, Parsons MB, et al. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2766-2773.
- [3] Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 1045-1050.
- [4] Zhou H, Ren H, Zhu B, et al. Optimization of pulsed-field gel electrophoresis for *Legionella pneumophila* subtyping. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(5): 1334-1340.
- [5] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2465-2466.
- [6] Kang XM, Xia X, Tang ZQ, et al. Legionnaires diseases report of case. Chin Med J, 1983, 96(2): 151-153.
- [7] Ma XY, Wang YQ, Peng XM, et al. Investigation of an legionnaires' disease outbreak associated with contaminated airconditioning system. Chin J Epidemiol, 1998, 19(4): 200-204. (in Chinese)
马晓燕,王玉琴,彭晓旻,等.一起空调系统导致上呼吸道感染样军团菌爆发调查.中华流行病学杂志,1998,19(4):200-204.
- [8] Ren HY, Zhu BQ, Zhou HJ, et al. Typing of *Legionella pneumophila* strains isolated from environmental water systems using pulsed-field gel electrophoresis. Dis Surveil, 2009, 24(12): 970-973. (in Chinese)
任红宇,朱兵清,周海健,等.环境水系分离嗜肺军团菌脉冲凝胶电泳的分型研究.疾病监测,2009,24(12):970-973.
- [9] Chen M, Chen ML, Wang GY, et al. Genotyping study on some strains of *Legionella pneumophila* serotype 1 in Shanghai by pulsed-field gel electrophoresis. J Environ Occupat Med, 2010, 27: 356-359. (in Chinese)
陈敏,陈明亮,王刚毅,等.2007年上海市部分嗜肺军团菌血清1型菌株PFGE分型研究.环境与职业医学,2010,27:356-359.
- [10] Garcia-Nuñez M, Sopena N, Ragull S, et al. Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial legionnaires' disease. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(2): 202-206.

(收稿日期:2010-12-02)

(本文编辑:张林东)

· 征 订 启 事 ·

本刊 2011 年征订启事

《中华流行病学杂志》是由中华医学会主办的流行病学及其相关学科的高级专业学术期刊、国内预防医学和基础医学核心期刊、国家科技部中国科技论文统计源期刊,2004—2009年被中国科学技术信息研究所定为“百种中国杰出学术期刊”,并被美国国立图书馆医学文献联机数据库(Medline)和美国化学文摘社(CAS)收录。读者对象为医学(预防医学、临床医学、基础医学及流行病学科研与教学)和健康相关学科的科研、疾病控制、临床、管理和教学工作者。刊稿范畴:重点或新发传染病现场调查与控制;慢性病的病因学及流行病学调查(含社区人群调查)、干预与评价;伤害的流行病学与防控;环境污染与健康;食品安全与食源性疾病;临床流行病学和循证医学;流动人口与疾病;行为心理障碍与疾病;分子和遗传流行病学与疾病控制;我国西部地区重点疾病的调查与控制;理论流行病学;流行病学教学与实践等。本刊设有述评,论著(原著)包括现场调查、监测、实验室研究、临床研究、基础理论与方法,疾病控制、国家课题总结、国外杂志华人研究导读(科海拾贝)、文献综述、问题与探讨等重点栏目。

全年出版 12 期,每期定价 9 元(含邮费),全年 108 元,由全国各地邮局统一订阅,邮发代号:2-73。本刊编辑部常年办理邮购。地址:北京昌平流字五号《中华流行病学杂志》编辑部,邮编:102206,电话(传真):010-58900730, Email:lxbonly@public3.bta.net.cn 欢迎广大读者踊跃投稿(<http://www.cma.org.cn>),积极订阅。

本刊编辑部