

沙门菌脉冲场凝胶电泳分型与血清型的对应关系

姜静 刁保卫 李杰 闫梅英 章丽娟 阚飙

【摘要】 目的 分析沙门菌脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)与血清分型之间的对应关系。方法 选择中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络 PulseNet China 沙门菌监测数据中鼠伤寒(Typhimurium)、肠炎(Enteritidis)、德尔卑(Derby)、阿贡纳(Agona)及山夫登堡(Senfenberg)前五位常见血清型菌株共1230株,进行PFGE聚类分析,以血清分型作为参照进行比对。确定这5种血清型PFGE优势带型的共有条带。结果 1230株菌株中,1149株经PFGE预测的血清型与实际血清型一致,PFGE预测血清型的准确率为93.4%。5种血清型经PFGE预测的血清型阳性预测值多在90.0%以上、阴性预测值均在95.0%以上。结论 PFGE聚类对5种常见血清型沙门菌血清分型具有较好的提示及验证作用。

【关键词】 沙门菌;脉冲场凝胶电泳;血清型

Correlation between pulsed-field gel electrophoresis profiles and *Salmonella* serotypes LOU Jing, DIAO Bao-wei, LI Jie, YAN Mei-ying, ZHANG Li-juan, KAN Biao. State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: KAN Biao, Email: kanbiao@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10004215) and Collaborative Program on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases between the Department of Health and Human Services of the United States of America and the Ministry of Health of the People's Republic of China (No. 5U2GGH000018-02).

【Abstract】 **Objective** To analyze the relationship between pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) subtyping and serotyping of *Salmonella* (S.). **Methods** PFGE was performed and profiles were analyzed on 1230 *Salmonella* isolates which comprising the top five serotypes including Typhimurium, Enteritidis, Derby, Agona and Senftenberg identified in China. The potential predictive relationship between PFGE banding patterns and particular serotypes was compared and the discriminatory consensus band class markers of individual serotypes were identified. **Results** Among all the 1230 *Salmonella* strains, 1149 strains were found consistent with serotyping through PFGE cluster analysis, providing the matching accuracy reaching 93.4%. For the five serotypes, the positive prediction rate appeared more than 90.0% and the negative prediction rate was over 95.0% on serotype cluster prediction. **Conclusion** Results presented in this study were representatives of the top 5 *Salmonella* serovars, showing that PFGE cluster analysis could provide clues to identity and confirmation of serotypes.

【Key words】 *Salmonella*; Pulsed-field gel electrophoresis; Serotype

沙门菌是导致食源性疾病的主要病原菌之一^[1],每年在中国引起的食物中毒和食源性疾病案例一直排名前三位^[2]。沙门菌血清型鉴定对于确定

疫情暴发、疾病溯源以及确立散发病例之间的关系具有重要作用^[3,4]。沙门菌血清型较多,超过2500种^[5],其鉴定受抗血清质量、实验人员的技术和经验影响较大,所需时间较长,且容易出现一定比例的误判^[6,7]。本研究利用中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络 PulseNet China 中沙门菌监测数据,分析我国常见血清型沙门菌的脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)与血清分型之间的对应关系,探讨PFGE协助血清型鉴定的可能性。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.06.019

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10004215);中美新发和再发传染病合作项目(5U2GGH000018-02)

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

姜静、刁保卫同为第一作者

通信作者:阚飙, Email: kanbiao@icdc.cn

材料与方 法

1. 实验菌株: PulseNet China 中沙门菌数据库里血清型数量居前五位的菌株共 1230 株, 分别为鼠伤寒(Typhimurium)665 株、肠炎(Enteritidis)309 株、德尔卑(Derby)137 株、阿贡纳(Agona)64 株、山夫登堡(Senftenberg)55 株。菌株为 2001—2010 年从我国 12 个省的患者(大部分)或食品(少量)分离而得。

2. PFGE 分型: 参照国际实验室分子分型监测网络 PulseNet 中“沙门菌 PFGE 标准化程序”进行操作。PFGE 图像利用 BioNumerics 5.1 软件进行处理, 经校准后, 使用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析, 构建聚类树, 分析菌株间的相似性。

3. PFGE 预测血清型评价指标: 以血清分型结果为参照标准, 评价 PFGE 用于预测血清型的效果, 包括灵敏度、特异度、阳性及阴性预测值, 具体计算方法参见文献[8]。

结 果

1. 沙门菌 PFGE 带型与血清型的关系: 聚类分析显示, 1230 株沙门菌分为 399 个 PFGE 带型, 相似度为 57.4%, 在共同的聚类中, 相同血清型菌株 PFGE 带型具有明显的聚集性, 根据血清型和 PFGE 带型的成簇, 划分为 5 个 PFGE 带型簇, 与各血清型的对应关系见图 1。山夫登堡血清型所处的 PFGE 带型簇总相似度为 64.5%、鼠伤寒为 68.0%、肠炎为 67.9%、德尔卑和阿贡纳分别为 74.9%、76.5% (图 1)。1149 株 PFGE 带型分群结果与实际血清型一致, PFGE 预测血清型的准确率为 93.4%。81 株未归属于相应血清型的 PFGE 带型簇中(表 1)。

表 1 1230 株沙门菌血清学分型与 PFGE 预测血清型的对应关系

PFGE 预测	实际血清型				
	山夫登堡	鼠伤寒	肠炎	德尔卑	阿贡纳
山夫登堡	49	3	4	2	0
鼠伤寒	0	643	3	6	4
肠炎	0	4	294	2	2
德尔卑	0	2	4	118	6
阿贡纳	0	1	1	2	45
其他	6	12	3	7	7
合计	55	665	309	137	64

2. PFGE 带型预测血清型结果的评价: 1230 株沙门菌中, 经 PFGE 带型聚类分析显示为山夫登堡的 58 株菌与实际血清型进行比较显示 49 株为山夫

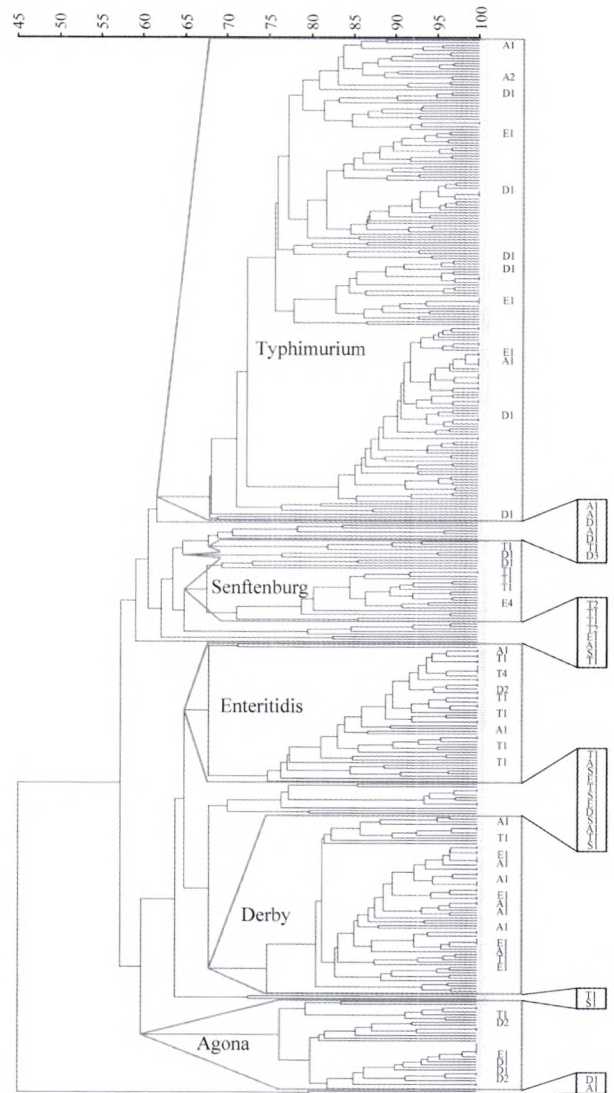


图 1 1230 株沙门菌 PFGE 聚类分析

登堡(灵敏度为 89.1%), 而 PFGE 带型簇中提示为非山夫登堡的 1172 株菌经过与实际血清型进行比较显示 6 株为山夫登堡, 特异度为 99.2%(表 2)。PFGE 带型用于预测鼠伤寒和肠炎血清型的灵敏度较高, 分别为 96.7% 和 95.1%, 预测 5 种血清型的特异度均在 97.0% 以上, 预测 5 种血清型阳性预测值多在 90.0% 以上、阴性预测值均在 96.0% 以上(表 3)。

表 2 沙门菌山夫登堡血清型的 PFGE 分型预测结果

PFGE 预测	实际血清型		合计
	山夫登堡(灵敏度)	非山夫登堡(特异度)	
山夫登堡	49(89.1)	9(0.8)	58
非山夫登堡	6(10.9)	1166(99.2)	1172
合计	55(100.0)	1175(100.0)	1230

注: 括号内数据为百分数(%)

3. 5 种血清型沙门菌 PFGE 共有条带分析: 分别挑选每个血清型 PFGE 的含菌株数最多的前五位优势带型, 利用 BioNumerics 软件中电泳条带的比对待

表 3 5 种血清型沙门菌 PFGE 预测血清型结果

血清型	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
山夫登堡	89.1	99.2	84.5	99.5
鼠伤寒	96.7	97.7	98.0	96.2
肠炎	95.1	99.1	97.4	98.4
德尔卑	86.1	98.9	90.8	98.3
阿贡纳	70.3	99.7	91.8	98.4

注:表内数据为百分数(%)

算功能,将条带标记长度进行比较,得到每种血清型的常见 PFGE 带型共有条带,见图 2。这些条带的组合形成不同血清型菌株 PFGE 成簇的重要依据。

讨 论

在沙门菌的监测及暴发调查工作中,观察到不

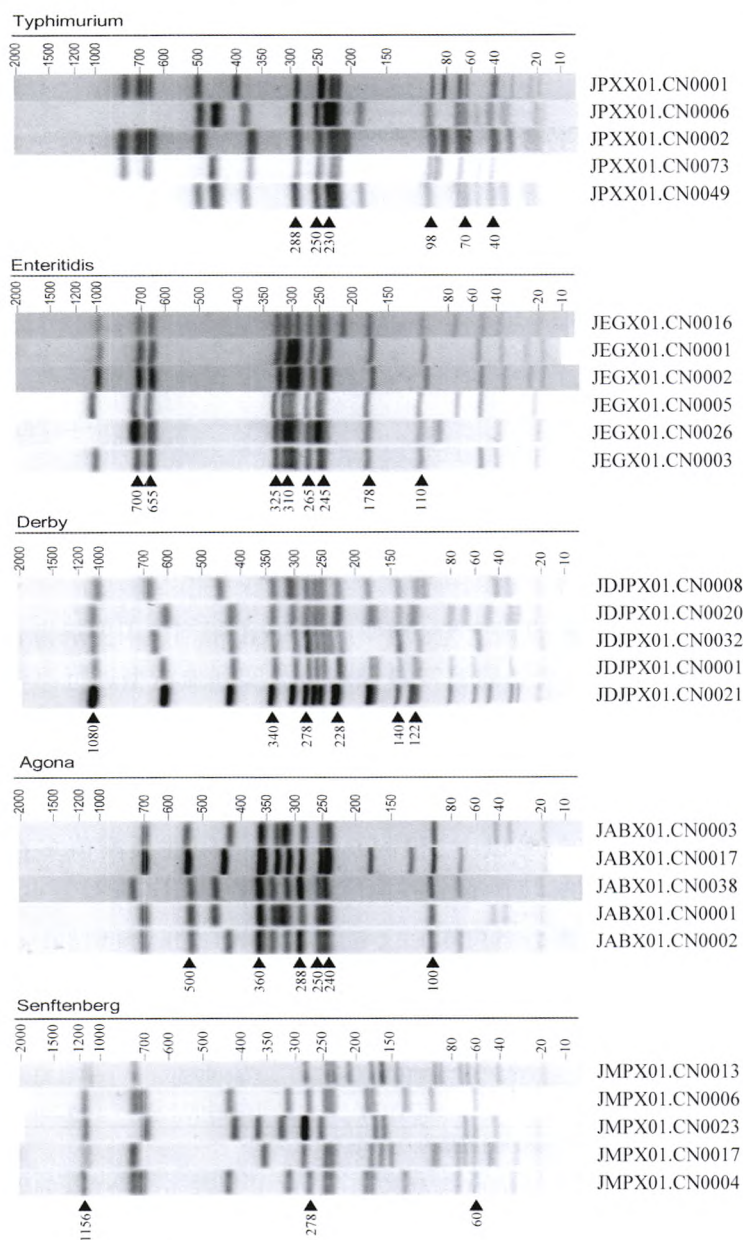


图 2 5 种血清型沙门菌优势带型的 PFGE 共有条带

同血清型菌株的 PFGE 具有血清型内成簇、血清型间有区别的现象,因此本研究中利用多年的实验数据,分析中国沙门菌常见血清型分离株的 PFGE 型别成簇及与血清分型的对应关系。

在菌株数量居前五位的沙门菌血清型中,PFGE 带型成簇分型与血清分型吻合的准确度达 93.4%。流行病学中筛检实验的评价指标也显示 PFGE 成簇与血清分型有很好的吻合度,阳性预测值与阴性预测值均很高。其中鼠伤寒沙门菌的阳性预测值最高,达到 98.0%,提示未知血清型的菌株如果经 PFGE 聚类显示与鼠伤寒沙门菌菌株聚为同一簇,那么血清分型判定为鼠伤寒沙门菌的概率为 98.0%。而山夫登堡血清型的菌株阳性预测值最低,仅为

84.5%,提示 PFGE 带型分析预测这种血清型时正确的概率相对较低,应更为慎重地进行复核。5 种血清型沙门菌株的阴性预测值最高的为山夫登堡沙门菌,提示如果菌株 PFGE 聚类结果与该血清型菌株没有聚为同一簇,基本上可以排除是这种血清型。

本研究比较并获得各血清型菌株 PFGE 的共有条带,不同血清型菌株 PFGE 带型相对成簇,可用于分析 PFGE 带型的保守性。鼠伤寒血清型的共有条带与文献报道相比^[9],国外报道菌株共同条带主要集中在 288 kb 以上,而我国该血清型的沙门菌菌株共有条带主要集中在 288 kb 以下。这些共有条带的确认是基于常见 PFGE 带型确认的,随着菌株样本的增加及菌株不断累积的变异,共有条带数目会减少,且每个条带会出现在大部分菌株,而不是所有的菌株中。从多年菌株监测来看,PFGE 条带在一定的变异范围内,相同血清型间的分布相似,提示不同血清型菌株基因组具有各自的特征。基于保守基因的多位点序列分型(MLST)常用于分析细菌长期进化^[10],对沙门菌的经典血清分型和 MLST 分析发现^[11],两者之间有良好的对应关系,但相互间也有较多的不一致,其中一个原因应是血清分型识别的抗原决定基因在遗传关系远的沙门菌菌株间水平转移,导致血清型相同而两者基因组进化上区别明显。本研究结果显示,

有些菌株不属于该血清型对应的 PFGE 带型簇,提示这些菌株的基因组变异较大。

虽然 PFGE 分型与血清分型并不是一一对应,但根据本研究和其他实验室的初步分析^[9],PFGE 带型在常见血清型菌株中有较好的成簇特征,因此用于两者分型实验结果的相互印证,尤其是对血清分型的提示有较大的价值。但是,PFGE 结果只能作为血清型鉴定的辅助工具,并不能替代血清分型。两者的最终作用不同,血清型更多用于病原学分析、流行菌株趋势分析;PFGE 主要用于流行病学监测和调查,据此特点,在未知菌株血清型而得到 PFGE 图谱时,即可进行图谱比对,尽早在数据库中比对分子分型,为流行病学调查提供信息。

参 考 文 献

- [1] Foley SL, Lynne AM, Nayak R. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *J Animal Sci*, 2007, 86: e149-162.
- [2] Chen Y, Guo YC, Wang ZT, et al. Foodborne disease outbreaks in 2006—report of the National Foodborne Disease Surveillance Network, China. *J Hygiene Res*, 2010, 39 (3) : 331-334. (in Chinese)
陈艳,郭云昌,王竹天,等. 2006 年中国食源性疾病暴发的监测资料分析. *卫生研究*, 2010, 39(3):331-334.
- [3] Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5(5) : 607-625.
- [4] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9) : 2233-2239.
- [5] Collins CH. *Microbiological methods*. New York: Plenum Press, 1967: 203-217.
- [6] Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, et al. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(5) : 1626-1635.
- [7] Li J, Nelson K, McWhorter AC, et al. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(7) : 2552-2556.
- [8] Chen PY. The evaluation index and its application of diagnostic tests. *Chin J Health Statistics*, 1991, 8(5) : 53-57. (in Chinese)
陈平雁. 诊断试验的评价指标及其应用. *中国卫生统计*, 1991, 8(5) : 53-57.
- [9] Gaul SB, Wedel S, Erdman MM, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved *Xba* I fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol*, 2007, 45 (2) : 472-476.
- [10] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6) : 3140-3145.
- [11] Achtman M, Wain J, Weill FX, et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog*, 2012, 8(6) : e1002776.

(收稿日期:2013-03-20)

(本文编辑:万玉立)

读者·作者·编者

中华医学会系列杂志已标注数字对象惟一标识符

数字对象惟一标识符(digital object identifier, DOI)是对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的一种工具。

为了实现中华医学会系列杂志内容资源的有效数字化传播,同时保护这些数字资源在网络链接中的知识产权和网络传播权,为标识对象的版权状态提供基础,实现对数字对象版权状态的持续追踪,自 2009 年第 1 期开始,中华医学会系列杂志纸版期刊和数字化期刊的论文将全部标注 DOI。即中华医学会系列杂志除科普和消息类稿件外,其他文章均需标注 DOI,DOI 标注于每篇文章首页脚注的第 1 项。由中华医学会杂志社各期刊编辑部为决定刊载的论文标注 DOI。

参照 IDF 编码方案(美国标准 ANSI/NISO Z39.84-2000)规定,中华医学会系列杂志标注规则如下:“DOI:统一前缀/学会标识.信息资源类型.杂志 ISSN.****-****.年期.论文流水号”。即:“DOI:10.3760/cma.j.issn.****-****.yyyy.nn.zzz”。

中华医学会系列杂志标注 DOI 各字段释义:“10.3760”为中文 DOI 管理机构分配给中华医学会系列杂志的统一前缀;“cma”为中华医学会(Chinese Medical Association)缩写;“j”为 journal 缩写,代表信息资源类别为期刊;“issn.****-****”为国际标准连续出版物号(ISSN);“yyyy”为 4 位出版年份;“nn”为 2 位期号;“zzz”为 3 位本期论文流水号。