

# 广东省2009—2011年鼠伤寒沙门菌监测及菌株分子分型的研究

黄燕惠 柯碧霞 孙九峰 何冬梅 陈清 柯昌文 俞守义

**【摘要】目的** 了解广东省鼠伤寒沙门菌监测现状及菌株分子分型特点,并初步建立数据库,为食源性疾病暴发追踪污染源及传播途径提供基线数据。**方法** 参考国际PulseNet公布的沙门菌脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型方案及7个位点的鼠伤寒沙门菌多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)方法,分析广东省2009—2011年10个市275株鼠伤寒沙门菌分型特点,利用BioNumerics软件建立分子分型数据库。**结果** 2009—2011年广东省沙门菌年均检出率为4.03%;鼠伤寒沙门菌年均检出率和构成比分别为1.38%和34.29%,均呈双峰形分布趋势,流行高峰为5和9月。275株鼠伤寒沙门菌经Xba I酶切和PFGE分析,获得124种带型,其分型D值为0.928 6,而MLVA分型获得143种型别,D值为0.966 5,分辨能力高于单酶切的PFGE分型。对其中>3株的相同带型进一步采用PFGE-Xba I - Bln I双酶切分型,获得分型共174种,D值为0.989 1,与采用MLVA方法相同,即对同一菌株的分辨结果具有较高一致性。**结论** 广东省鼠伤寒沙门菌具有遗传多样性。初步建立的菌株分子分型数据库显示采用MLVA分型方法可完成菌株聚集性分析,以确认鼠伤寒沙门菌引起的暴发。

**【关键词】** 鼠伤寒沙门菌;加强监测;分子分型

**Molecular typing and surveillance on *Salmonella typhimurium* strain in Guangdong province, 2009–2011** Huang Yanhui<sup>1,4</sup>, Ke Bixia<sup>2</sup>, Sun Jiufeng<sup>3</sup>, He Dongmei<sup>2</sup>, Chen Qing<sup>1</sup>, Ke Changwen<sup>2</sup>, Yu Shouyi<sup>1</sup>. 1 Department of Epidemiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2 Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou; 3 Guangdong Provincial Institute of Public Health; 4 Department of Skin Venereal Disease Prevention and Control, Baoan District Chronic Disease Hospital

Corresponding author: Ke Bixia, Email: kebixia@live.cn

This work was supported by grants from the Medical Science and Technology Research of Guangdong Province (No. 2013A074) and the China-United States Collaborative Program on Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases (No. 1U2GGH000018–01).

**【Abstract】 Objective** To understand the distribution and the characteristics on molecular typing of *Salmonella* (*S.*) *typhimurium* isolates gathered from the surveillance program and to construct the standard *S. typhimurium* databank in the laboratory through surveillance network PulseNet, in Guangdong province to improve the capability of detection on laboratory-based foodborne outbreaks. **Methods** With the application of standard pulse-field gel electrophoresis (PFGE) and multiple loci VNTR analysis (MLVA) including seven VNTRs loci protocols on PulseNet International Network, 275 isolates of *S. typhimurium* from ten cities in Guangdong province were typed and their patterns analyzed. The molecular typing databank was constructed by BioNumerics. **Results** With *S. typhimurium* the most common serotypes, the average annual positive rate of *Salmonella* strains and *S. typhimurium* were 4.03% and 1.38% respectively. The positive rate and proportion presented a double-peak trend, appearing in May and September. The chromosomal DNA of *S. typhimurium* was digested with Xba I restricted endonucleotidase and 124 PFGE patterns were observed after pulse-field gel electrophoresis, with the discrimination index (*D*)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.08.010

基金项目:广东省医学科技研究基金(2013A074);中美新发和再发传染病合作项目(1U2GGH000018–01)

作者单位:510515 广州,南方医科大学公共卫生与热带医学学院流行病学系(黄燕惠、陈清、俞守义);广东省疾病预防控制中心(柯碧霞、何冬梅、柯昌文);广东省公共卫生研究院(孙九峰);深圳市宝安区慢性病防治院皮肤病防治科(黄燕惠)

黄燕惠、柯碧霞同为第一作者

通信作者:柯碧霞, Email: kebixia@live.cn

as 0.928 6. The patterns including more than three *S. typhimurium* isolates and were further digested with the second enzyme *Bln I* to achieve 174 patterns, with the *D* value as 0.989 1. Under MLVA method, 143 variant patterns were obtained, with the *D* value reaching 0.966 5. Data showed that the discriminatory ability of the MLVA typing method in *S. typhimurium* was superior to PFGE-*Xba I* but equal to PFGE-*Xba I* - *Bln I*. In addition, when *S. typhimurium* strains were respectively analyzed by PFGE under double enzymes digestion and MLVA, the results appeared coincident and relative.

**Conclusion** The variant patterns showed by the two molecular typing methods indicating a genetic diversity existed among the clinical *S. typhimurium* isolates in Guangdong province. Databank of *S. typhimurium* was constructed and could be used in laboratory surveillance programs. Under the characterization of analyzing similarity and evolution among *S. typhimurium* isolates, MLVA was suitable for cluster analysis on early detection of outbreaks caused by *S. typhimurium*.

**【Key words】** *Salmonella typhimurium*; Enhance Salmonella Surveillance; Molecular typing

鼠伤寒沙门菌胃肠炎或食物中毒是全球食品加工及其贸易流通导致的非伤寒沙门菌食源性疾病。目前该菌引起的食物中毒事件已由先前的点源性集中暴发,转变为跨地区的“散在暴发”,而追踪污染源及传播途径依赖于菌株分子分型手段<sup>[1-3]</sup>。脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)已成功应用于多起鼠伤寒沙门菌食源性疾病暴发的溯源<sup>[2-4]</sup>。广东省为建立实验室主动监测系统和菌株分子分型网络库,自2009年正式启动食源性疾病加强监测(ESS),以发现鼠伤寒沙门菌感染腹泻病例的优势菌型。本研究对2009—2011年ESS各监测点医院鼠伤寒沙门菌临床分离株进行PFGE、MLVA分型,以分析菌株间的分子遗传特征及其关联性,为溯源鼠伤寒沙门菌食源性疾病暴发提供依据。

## 材料与方法

1. ESS及其病例:选择广东省珠三角(广州、中山、珠海、江门、东莞和佛山)及东(揭阳)、西(茂名、阳江)、北(韶关)部10个城市的24家医院为监测哨点医院。本文疑似非伤寒沙门菌病例定义为排便 $\geq 3$ 次/日且粪便性状有改变,并符合以下任何一条标准:①发热(体温 $> 38^\circ\text{C}$ ),或伴有头痛、寒战、疲劳;②有恶心、呕吐或腹痛等消化道症状的门诊/住院腹泻病患者。

### 2. 材料:

(1)实验菌株:来源于2009—2011年ESS监测系统275株鼠伤寒沙门菌;PFGE相对分子质量标准菌株为沙门菌Bmenderup血清型菌株H9812,MLVA分型的阳性对照株为鼠伤寒沙门菌LT2(ATCC29946),均由中国疾病预防控制中心分发,保存于广东省疾病预防控制中心。

(2)主要试剂和仪器:包括连四硫磺酸(TTB)增菌液、沙门菌显色培养基及双糖铁、VP、 $\beta$ -半乳糖苷

酶(ONPG)、尿素、靛基质和赖氨酸微量生化管均购自广东环凯微生物科技有限公司,诊断血清为泰国S&A公司产品,API 20E手工细菌生化鉴定条和Cary Blair运送培养基为法国生物梅里埃公司产品,XLD平板、MH平板购自广州迪景微生物科技有限公司,*Xba I*、*Bln I*酶购自美国Promega公司,琼脂糖为美国Cambrex公司产品,蛋白酶K为德国Merck公司产品。PCR反应仪为美国ABI公司产品,CHEF MAPPER琼脂糖凝胶电泳仪、CHEF MAPPER XA脉冲场凝胶电泳仪和GEL Doc EQ凝胶成像分析系统为美国Bio-Rad公司产品,BioMate 3S分光光度计为美国Thermo Fisher公司产品,比浊仪为美国Dade Behring公司产品,BioNumerics软件购自Applied Maths公司。

### 3. 研究方法:

(1)菌分离、培养及鉴定:根据GB 4789.4-2010中沙门菌检验方法,制定广东省ESS方案沙门菌标准检验程序<sup>[1]</sup>。

(2)PFGE分型:参照美国PulseNet沙门菌PFGE标准操作方法<sup>[5]</sup>。应用BioNumerics(Version 5.1)软件处理PFGE图像,使用非加权配对算术平均法(unweighted pair group average method)进行聚类分析。

(3)MLVA分型:参考国际实验室分子分型监测网络PulseNet公布的鼠伤寒沙门菌MLVA分型标准方案<sup>[6]</sup>,采用7个VNTR位点,根据位点合成相应引物,并在引物5'端标记荧光基团,根据预实验的结果调整试验退火温度和循环次数(表1)。每株菌的扩增产物(位点按ST3-ST5、ST7-STTR10、ST2-ST6-ST8混合形式混匀)使用ABI3700测序仪进行毛细管电泳检测,计算每个VNTR位点的重复数,使用软件BioNumerics进行最小生成树(minimum spanning tree)分析,构建参数为creation of complex: 1 changes。

表 1 本研究鼠伤寒沙门菌 MLVA-7 位点实验方案

位点	荧光染料 <sup>a</sup>	退火温度(°C)	引物序列(5' ~ 3')	重复基序、侧翼大小、LT2 产物长度(bp)及重复数
ST3-F	HEX	54	GT TCT TCT GCA ACG CAG GCA	12-156-190-5
ST3-R			GAT GGC ATG ACG CTG CAA CG	
ST5-F	FAM	54	TT TTC GCT CAA CAA ACT T	6-139-219-14
ST5-R			ACA GCA CCA GAA GCA AT	
ST7-F	ROX	54	CG ATT GAC GAT ATC TAT GAC TT	9-117-157-5
ST7-R			GTT TTT CAC GTT TGC CTT TC	
STTR10-F	HEX	54	CG GGC GCG GCT GGA GTA TTT G	6-311-376-11
STTR10-R			GAA GGG GCC GGG CAG AGA CAG C	
ST2-F	FAM	63	CA ACG CCT GTT CAG CAA C	39-62-370-24
ST2-R			ATC AAC AGC GGG TGG AT	
ST6-F	ROX	63	AG CAG TGG CTG GCG GGA AAC C	6-191-271-13
ST6-R			GCA GCC GGA CAG GGG ATA AGC C	
ST8-F	HEX	54	GC AGG TGT GGC TAT TGG CGT TGAA AA	33-196-556-33
ST8-R			GAT GGT GAC GCC GTT GCT GAA GG	

注:引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;<sup>a</sup> 荧光基团均标记于上游引物 5' 端

(4) D 值计算<sup>[7]</sup>: 评价分型方法的分辨能力通常采用基于 Simpson 的分辨系数, 即以 D 值表示, 可直接比较不同分型方法及其不同组合后的效果。其公式

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

式中, S 为能识别出的不同带型数, n<sub>j</sub> 是第 j 类带型的菌株数, N 为菌株总数。

4. 统计学分析: 将 BioNumerics 的分型结果与菌株基本资料以 txt 的形式导出, 并整理成 Excel 2003 数据信息表, 再导入 SPSS 13.0 软件并建立数据库, 分析菌株主要带型的地区、时间、人群分布, 组间比较采用 χ<sup>2</sup> 检验, α=0.05 为统计学检验水准。

## 结 果

### 1. 监测概况: 2009—2011 年广东省 ESS 监测系

表 2 2009—2011 年广东省 ESS 检出沙门菌和鼠伤寒沙门菌的地区分布

地区	2009 年					2010 年					2011 年					合计				
	样本份数	沙门菌株数	检出率 (%)	鼠伤寒菌株数	构成比 (%)	样本份数	沙门菌株数	检出率 (%)	鼠伤寒菌株数	构成比 (%)	样本份数	沙门菌株数	检出率 (%)	鼠伤寒菌株数	构成比 (%)	样本份数	沙门菌株数	检出率 (%)	鼠伤寒菌株数	构成比 (%)
广州	611	23	3.76	5	21.74	4 387	124	2.83	50	40.32	3 678	129	3.51	40	31.01	8 676	276	3.18	95	34.42
茂名	42	3	7.14	1	33.33	239	18	7.53	10	55.56	479	23	4.80	11	47.83	760	44	5.79	22	50.00
阳江	91	7	7.69	4	57.14	385	14	3.64	5	35.71	560	25	4.46	12	48.00	1 036	46	4.44	21	45.65
中山	669	31	4.63	8	25.81	2 469	70	2.84	35	50.00	1 899	90	4.74	16	17.78	5 037	191	3.79	59	30.89
珠海	83	14	16.87	9	64.29	193	27	13.99	14	51.85	567	52	9.17	11	21.15	843	93	11.03	34	36.56
江门	69	3	4.35	0	0.00	362	9	2.49	2	22.22	553	12	2.17	4	33.33	984	24	2.44	6	25.00
东莞	-	-	-	-	-	599	39	6.51	19	48.72	637	50	7.85	8	16.00	1 236	89	7.20	27	30.34
韶关	-	-	-	-	-	21	1	4.76	1	100.00	1 057	2	0.19	1	50.00	1 078	3	0.28	2	66.67
佛山	-	-	-	-	-	141	1	0.71	0	0.00	104	34	32.69	9	26.47	245	35	14.29	9	25.71
揭阳 <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0	0.00	-	1	-	0	0.00
合计	1 565	81	5.18	27	33.33	8 796	303	3.44	136	44.88	9 534	418	4.38	112	26.79	19 895	802	4.03	275	34.29

注: <sup>a</sup> 揭阳市人民医院于 2011 年 11 月加入 ESS, 确认 1 株沙门菌, 样本数未统计

统共收集样本 19 895 份, 沙门菌年均检出率为 4.03% (802/19 895), 其中鼠伤寒沙门菌年均检出率、构成比分别为 1.38% (275/19 895)、34.29% (275/802), 已成为广东省沙门菌优势血清型(表 2)。275 株鼠伤寒沙门菌, 以 2010 年检出的构成比最高 (44.88%, 136/275), 每年 5、9 月为发病高峰(图 1), 男女性别比为 1.57:1, 不同年份性别间的差异无

统计学意义 (χ<sup>2</sup>=0.95, P>0.05), 0~1 岁婴幼儿为主要发病人群 (157/275, 57.09%), 各年份不同年龄段的差异有统计学意义 (χ<sup>2</sup>=10.75, P<0.05), 主要分布于广州 (95/275, 34.55%)、中山 (59/275, 21.45%) 等市。

### 2. 鼠伤寒沙门菌 PFGE 分子分型:

(1) PFGE-Xba I 带型聚类分析: 275 株鼠伤寒沙门菌经 Xba I 酶切, 进行 PFGE 分型(图 2)。结果显示菌株间相似值为 56.09%~100.00%, 共分为 124 种不同带型、7 大聚类簇, A、B、E、F、G 聚类簇的病例呈散在分布, 聚类相似值为 66.67%~73.38%, 菌株数分别为 2、13、5、3、6 株, 主要检出地区集中在广州、中山、东莞; C、D 簇的聚类特点显示具有一定的地域聚集性, 聚类相似值分别为 77.23%、77.65%, 分别由 53、192 株菌组成, 主要来源于珠三角地区的城市, 菌株在种群内、种群间的联系不仅具有时间连续



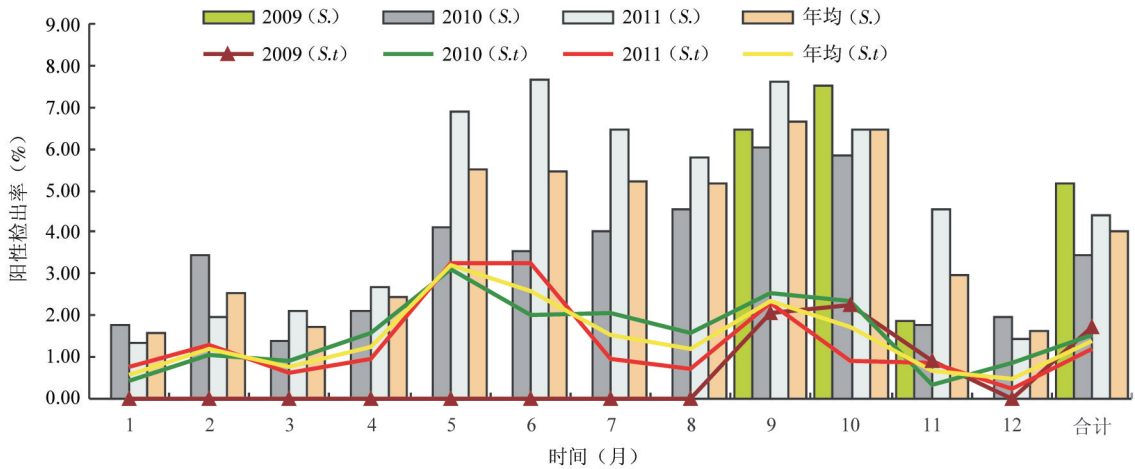


图1 2009—2011年广东省ESS沙门菌流行趋势

性,同时亦与省内其他监测城市有空间联系。

(2) PFGE-*Xba* I 带型分布:PFGE分型共获得124种带型, $D=0.9286$ ,每种带型包含1~71株菌,平均每种带型有2.22株菌,有17种带型在不同年份交叉出现(表3),其余107种带型属于每个年份的独特带型。 $\geq 3$ 株菌有16种带型,其带型频率分布见表4。其中71株为优势带型JPXX01.GD0004,主要包括广州21株(29.6%)、中山17株(23.9%)、东莞14株(19.7%),均分离自不同年代的腹泻患者;时间主要集中于2010年,共51株(71.8%),其中以5月(19.72%,14/71)、9月(15.49%,11/71)居多;性别分布以男性为主(60.6%,43/71),年龄以0~1岁婴幼儿为主(53.5%,38/71),与菌株的总体流行特征一致。不同地区、年代、性别以及年龄组间分布的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表3 2009—2011年广东省ESS中鼠伤寒沙门菌17种PFGE带型分布

PFGE带型	2009年	2010年	2011年	合计
JPXX01.GD0003	-	1	1	2
JPXX01.GD0004	6	51	14	71
JPXX01.GD0005	-	7	4	11
JPXX01.GD0006	-	2	1	3
JPXX01.GD0010	-	3	1	4
JPXX01.GD0015	-	2	1	3
JPXX01.GD0019	-	4	1	5
JPXX01.GD0023	-	1	1	2
JPXX01.GD0031	-	1	1	2
JPXX01.GD0032	-	4	5	9
JPXX01.GD0040	-	5	1	6
JPXX01.GD0046	-	1	1	2
JPXX01.GD0055	1	3	2	6
JPXX01.GD0062	1	-	1	2
JPXX01.GD0069	1	-	1	2
JPXX01.GD0071	3	-	1	4
JPXX01.GD0076	1	1	-	2
菌株数合计	13	86	37	136

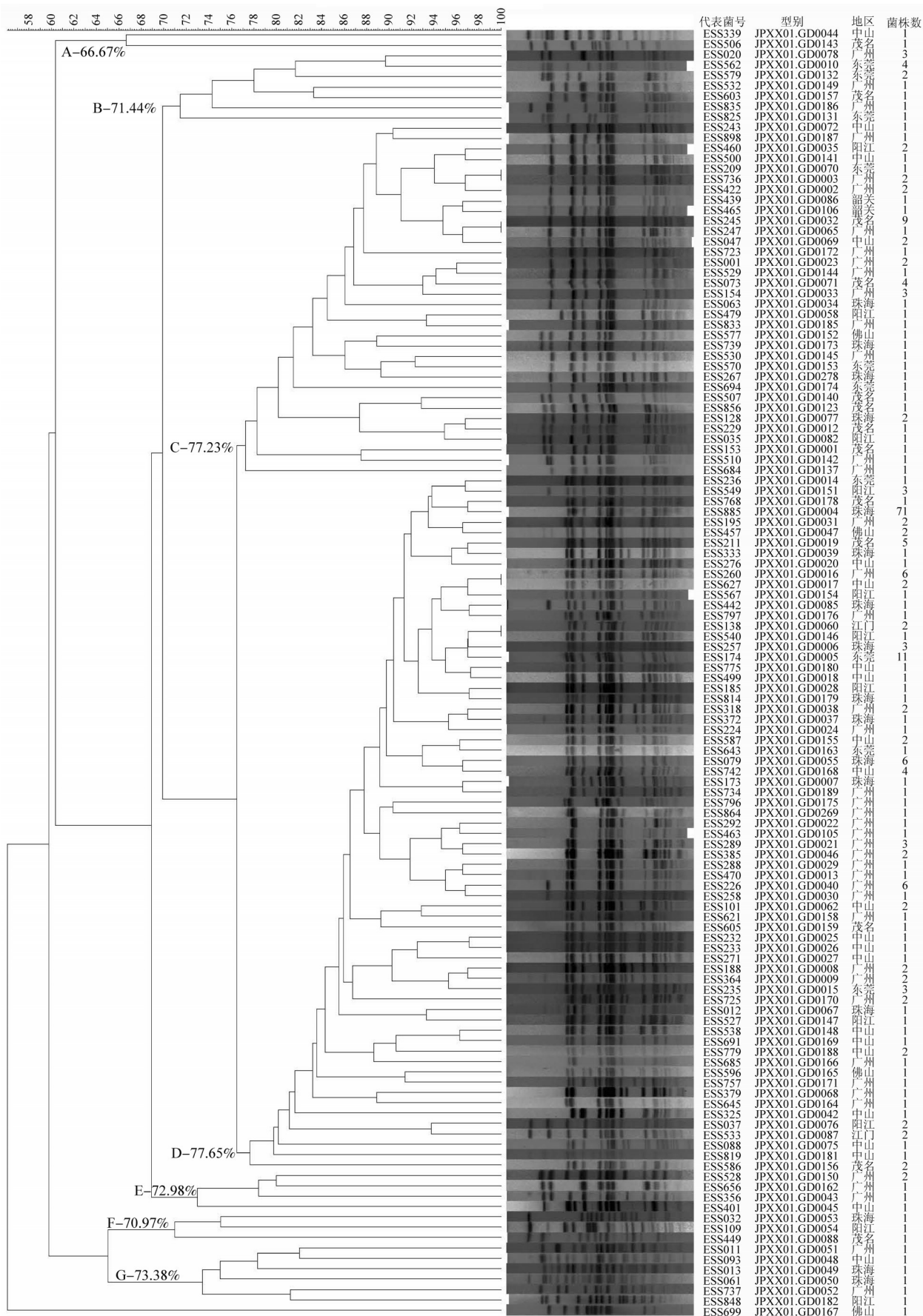
表4 鼠伤寒沙门菌PFGE-*Xba* I 带型分布

PFGE- <i>Xba</i> I 型别	构成比(%) / 菌株数	PFGE- <i>Xba</i> I 条带
JPXX01.GD0004	0.257 2/71	
JPXX01.GD0005	0.039 9/11	
JPXX01.GD0032	0.032 6/9	
JPXX01.GD0016	0.021 7/6	
JPXX01.GD0040	0.021 7/6	
JPXX01.GD0055	0.021 7/6	
JPXX01.GD0019	0.018 1/5	
JPXX01.GD0010	0.014 5/4	
JPXX01.GD0071	0.014 5/4	
JPXX01.GD0168	0.014 5/4	

注:表内仅列出菌株数>3的相同PFGE型别

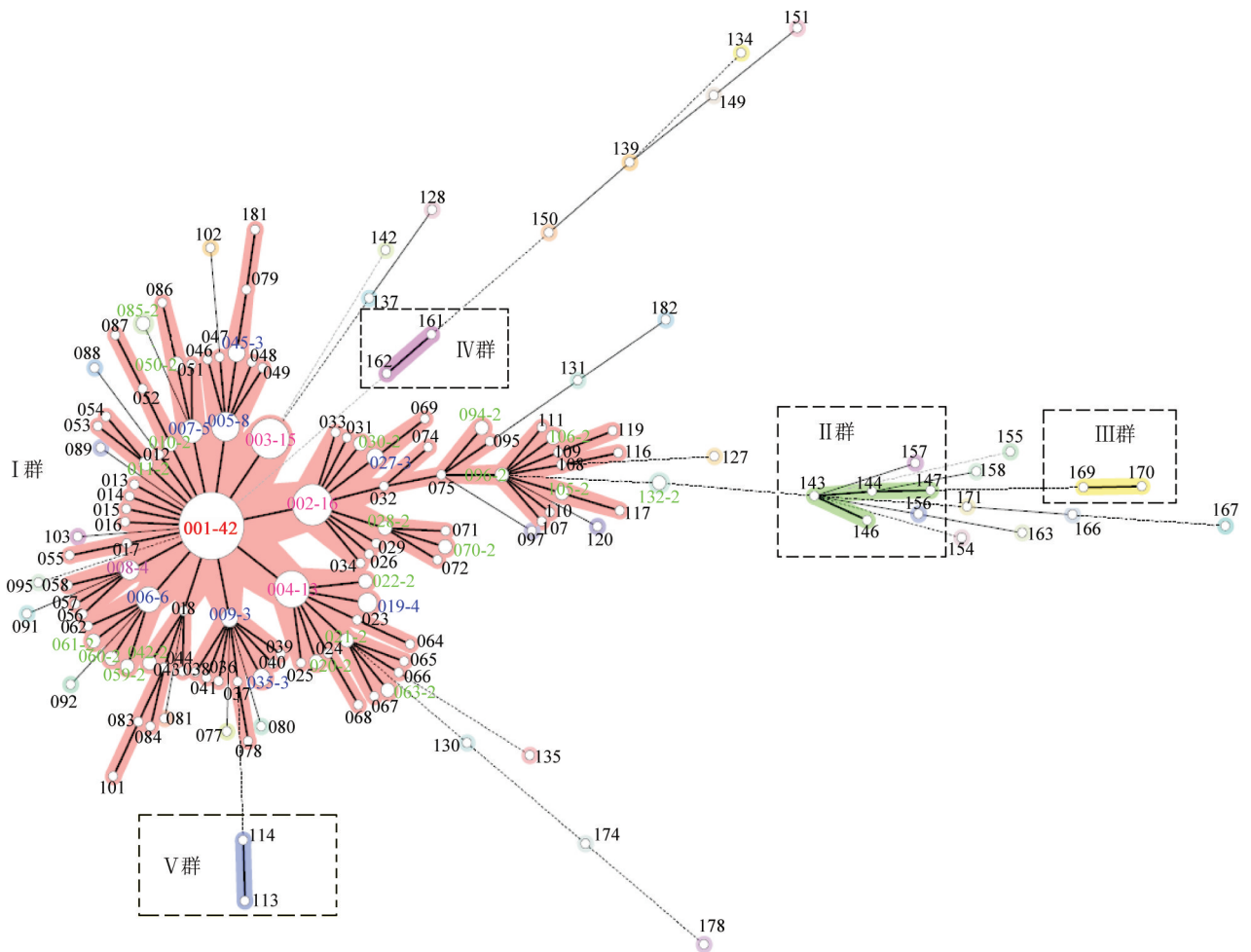
### 3. 鼠伤寒沙门菌MLVA分子分型:

(1) MLVA 型别生成树分析:所有菌株经毛细管电泳检测,计算VNTR位点的重复数,使用BioNumerics软件进行最小生成树分析(图3)。以 $\leq 1$ 位点的差异对菌株分型,共分为143种型别,最小生成树将所有的MLVA型分为5群(I~V群),其中I群包括94个型别184株菌,主要由6个亚群组成,其中以型别002作为支点的进化群亲缘关系变化层次较多,形成I群中最大的一簇亚群,主要源自广州、中山市腹泻病例粪便样本分离株(34株),除韶关、揭阳市,其余8个监测城市呈散在分布,而集中于珠三角地区的城市,其地域聚集分布的趋势与PFGE结果一致,其他型别亲缘关系相对较远,这与菌株来源分散有关。



注:带型相同归为同一型别并统一编号,统计编号相同菌株,挑选有代表性的菌株条带进行聚类分析

图2 广东省275株鼠伤寒沙门菌 Xba I 酶切 PFGE 分型



注：圆圈内(外)数字为MLVA型别编码，型别后的数字为该型别菌株数，深红色(如001-42)为菌株数>20，粉红色(如002-16)为10~20株，蓝色(如005-8)为3~9株，绿色(如010-2)为2株，型别后无数字者均表示1株菌；其他颜色表示菌株的亲缘关系，粗短线连接2个MLVA型别意味单一VNTR基因位点不同，而细长线表示2个基因位点不同，虚线代表2个以上基因位点的差异

图3 2009—2011年广东省275株鼠伤寒沙门菌的MLVA分型

(2)MLVA型别分布:275株鼠伤寒沙门菌分为143种型别,  $D=0.9665$ , 每种型别有1~42株菌, 平均每种带型包含1.92株菌,  $\geq 3$ 株型别有13种, 型别频率分布见表5。其中优势型别为001 (MLVA型别:5-10-4-8-24-11-33)42株, 主要分离自广州(15株, 35.7%)、阳江(7株, 16.7%)、中山(6株, 14.3%)以及珠海(5株, 11.9%), >50.0%来源于2010年的腹泻患者, 每年5-9月为优势条带菌株的高峰期, 占全年的81.0%(34/42), 以男性为主(27/42, 64.3%), 并集中于0~1岁组(27/42, 64.3%), <5岁儿童占92.9%。不同地区、年代、性别以及年龄组间分布的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

4. MLVA和PFGE分型能力的比较:

(1)分型能力的总体比较:MLVA方法的  $D$  值(0.9665)大于PFGE-*Xba*I单酶切分型的  $D$  值(0.9286), 而与PFGE-*Xba*I-*Bln*I双酶切分辨能力( $D=0.9891$ )相当。主要由于ST5、STTR10、ST6

及ST8的多态性较高,  $D$  值分别为0.6648、0.7543、0.6546、0.4190。

表5 鼠伤寒沙门菌MLVA型别分布

MLVA 型别编码	型别频率(数量)	MLVA 型别
GDMT001	0.152 7(42)	5-10-4-8-24-11-33
GDMT002	0.058 2(16)	5-10-4-9-24-11-33
GDMT003	0.054 5(15)	5-10-4-7-24-11-33
GDMT004	0.047 3(13)	5-11-4-8-24-11-33
GDMT005	0.029 1(8)	5-10-4-10-24-11-33
GDMT006	0.021 8(6)	5-10-4-11-24-11-33
GDMT007	0.018 2(5)	5-10-4-12-24-11-33
GDMT008	0.014 5(4)	5-9-4-8-24-11-33
GDMT019	0.014 5(4)	5-11-4-7-24-11-33
GDMT009	0.010 9(3)	5-10-4-8-24-12-33
GDMT027	0.010 9(3)	5-11-4-9-24-11-33
GDMT035	0.010 9(3)	5-10-4-7-24-12-33
GDMT045	0.010 9(3)	5-10-4-10-24-12-33

注:表中仅列出菌株数 $\geq 3$ 株的相同MLVA型别;GD代表广东省,MT代表MLVA型别,MLVA型别位点的排列顺序为ST3-ST5-ST7-STTR10-ST2-ST6-ST8



(2)分型结果的对应关系:对 71 株 PFGE-*Xba* I 分型后的优势带型 JPXX01.GD0004,进一步采用 *Bln* I 酶切(PFGE-*Bln* I),获得 31 种带型(表 6,其中 3 株 *Bln* I 酶切不能比对,未计算在内),JPXA26.GD0001 为优势带型。MLVA 将 68 株菌分为 41 个型,其中 001 型 6 株、002 型 4 株、003 型 2 株、005 型 3 株及 007 型 2 株均对应于 PFGE-*Bln* I 的部分 JPXA26.GD0001 型及部分 JPXA26.GD0006、0005、0036、0050、0017 型。分析显示 MLVA 将 *Bln* I 酶切后的条带进一步区分为不同的型别,证实 MLVA 分型方法的可靠性。

### 讨 论

2009—2011 年广东省 ESS 中沙门菌平均检出率为 4.03%,高于 2008 年的检出率 3.69%<sup>[8]</sup>,但低于 2007 年的检出率 6.29%<sup>[9]</sup>,与国内其他城市(2%~5%)相当,但低于发达国家(5%~8%),与采样量和检测方法相关<sup>[10,11]</sup>。广东省年均检出率较高的城市依次为佛山、珠海、东莞,这与菌株的地区分布特点、监测点医院的数目与类型(妇幼保健院)有关,上述地区工业发达,外来务工人员密集,已成为食源性疾病频发的流行地区。鼠伤寒沙门菌是非伤寒沙门菌感染性腹泻的优势菌型,其年均构成比为 34.29%,且每年几乎都有“散在”暴发的报道<sup>[2,3,12,13]</sup>。男性为

主要感染人群,0~1 岁婴幼儿占 60%,主要分布于广州和中山市,3 年间菌株的流行变化趋势大致相同,呈双峰分布,高峰出现在 5—6 月和 9—10 月,表现为季节的交替变化。

PFGE 已作为众多国家公共卫生实验室用以区分暴发菌株和溯源的“金标准”<sup>[14,15]</sup>。目前早期发现沙门菌食源性疾病暴发在很大程度上依赖于菌株的分子分型技术,而 MLVA 作为第二代分子分型技术特别是对那些 PFGE 分型不理想或不适用的致病菌,显示出一定的优势。本研究对 275 株鼠伤寒沙门菌进行 PFGE 和 MLVA 分子分型,结果表明 PFGE-*Xba* I 带型相似值较高、MLVA 型别亲缘进化关系密切的菌群,其分布特点与菌株流行趋势相似,且主要集中于菌株分离较多的广州和中山地区,呈地域聚集性,感染人群则以 0~1 岁男性婴幼儿为主,优势型别的流行病学趋势也有相同表现,季节流行趋势与菌株检出情况相一致。MLVA 分型的 *D* 值高于 PFGE-*Xba* I 单酶切,与 PFGE-*Xba* I-*Bln* I 双酶切的分辨能力相当。与 PFGE-*Xba* I 条带的分析结果相比较,MLVA 分型对同一血清型或同一菌群,不仅显示高的分辨力,而且基于多个 VNTR 位点重复数的分型,可以揭示菌群亲缘进化关系的微小变化,结合 MLVA 的最小生成树、MLVA 型别分布以及 VNTR 位点重复数频率分布分析,表明高度基因多

态性的同时,分型结果有一定的变化规律,即从 GDMT001 型为始祖的第一大菌群,常见的变化位点为 STTR10、ST5、ST6,这三个位点的单独变化或者两两组合发生变化,就会表现为其他常见的 MLVA 型别,如 STTR10 的重复数为 7、9、10、11、12 时,由 001 型可变化为 003、002、005、006、007,说明分型和亲缘进化关系主要与位点的多态性有关<sup>[16]</sup>。除了 ST3、ST7 及 ST2 位点的多态性较低,与张京云等<sup>[17]</sup>报道的相符合,其他 VNTR 位点均具有较高的多态性,*D* 值均 >0.4,主要由于位点重复数的种类多样,并且出现单菌株表现一种重复类型的情况,这与国内外相关报道相符<sup>[18-21]</sup>。

表 6 鼠伤寒沙门菌 PFGE 优势带型与 MLVA 分型结果的对应关系

PFGE- <i>Xba</i> I (菌株数)	PFGE- <i>Bln</i> I (菌株数) <sup>a</sup>	MLVA(菌株数)
JPXX01.GD0004(71)	JPXA26.GD0001(23)	001(3) 002(1) 003(1)
		004(3) 005(2) 007(1)
		008(2)
	JPXA26.GD0006(5)	001(1) 002(2)
		007(1) 038(1)
	JPXA26.GD0005(4)	002(1) 003(1)
		062(1) 070(1)
	JPXA26.GD0036(4)	005(1) 009(1)
		086(1) 102(1)
	JPXA26.GD0050(3)	001(2) 162(1)
	JPXA26.GD0004(2)	070(1) 119(1)
	JPXA26.GD0015(2)	027(1) 110(1)
	JPXA26.GD0017(2)	003(1) 149(1)

注:<sup>a</sup> 仅列出 ≥2 株的相同 PFGE 型别

MLVA 分型不仅与 PFGE 二次酶切的结果相一致,而且可将 PFGE-*Xba* I 优势带型 JPXX01.GD0004 二次酶切后的条带进一步区分为相同或不同的型别,通过对照流行病学资料以证实感染者在人群、地区以及时间上的联系。表明 MLVA 分子分型技术,不仅可从宏观上对菌株的相似性进行分析,且可从微观上揭示菌株的亲缘进化关系,用于及时监测潜在或散在的感染暴发。

### 参 考 文 献

- [1] Chiou CS, Hung CS, Torpdahl M, et al. Development and evaluation of multilocus variable number tandem repeat analysis for fine typing and phylogenetic analysis of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 142 (1): 67-73.
- [2] Torpdahl M, Sørensen G, Lindstedt BA, et al. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella typhimurium* infections [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(3): 388-395.
- [3] Lindstedt BA, Heir E, Gjernes E, et al. DNA fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* with emphasis on phage type DT104 based on variable number of tandem repeat loci [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (4): 1469-1479.
- [4] Torpdahl M, Sorensen G, Ethelberg S, et al. A regional outbreak of *S. typhimurium* in Denmark and identification of the source using MLVA typing [J]. *Euro Surveill*, 2005, 11(5): 134-136.
- [5] Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, 3(1): 59-67.
- [6] Laboratory standard operating procedure for PulseNet MLVA of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium*—Applied Biosystems Genetic Analyzer Platform [DB/OL]. [http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/mlva/2013%20updates/PNL24\\_MLVA\\_SalmTABIProtocol.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/mlva/2013%20updates/PNL24_MLVA_SalmTABIProtocol.pdf).
- [7] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity [J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(11): 2465-2466.
- [8] Ke BX, Deng XL, Li BS, et al. Surveillance on *Salmonella* infection in Guangdong province, 2008-2009 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(8): 789-792. (in Chinese)  
柯碧霞, 邓小玲, 李柏生, 等. 广东省 2008-2009 年沙门菌监测 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(8): 789-792.
- [9] Ke BX, Deng XL, Zhang LH, et al. Surveillance and pathogenic analysis on non-typhoidal *Salmonella* in Guangdong province, 2007 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29 (12): 1199-1203. (in Chinese)  
柯碧霞, 邓小玲, 张丽华, 等. 广东省 2007 年度非伤寒沙门菌监测及病原学特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(12): 1199-1203.
- [10] Xu XB, Gu BK, Jin HM, et al. Development of optimum method to detected *Salmonella* from clinical fecal specimens and analyzed character of phenotype [J]. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28 (8): 828-829. (in Chinese)  
许学斌, 顾宝柯, 金汇明, 等. 沙门菌检测在临床粪便样品的优化方法建立和表型特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 28 (8): 828-829.
- [11] Huang Z, Xu XB, Zhang L. Application of optimum method to detect *Salmonella* from clinical fecal specimens [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(8): 1453-1455. (in Chinese)  
黄峥, 许学斌, 张岭. 沙门菌检测在临床粪便样品的优化方法应用 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(8): 1453-1455.
- [12] Fuller CC, Jawahir SL, Leano FT, et al. A multi-state *Salmonella typhimurium* outbreak associated with frozen vacuum-packed rodents used to feed snakes [J]. *Zoonoses Public Health*, 2008, 55 (8-10): 481-487.
- [13] Malorny B, Junker E, Helmuth R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8(1): 84.
- [14] Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(5): 1070-1074.
- [15] Landeras E, Gonzalez-Hevia MA, Alzugaray R, et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(9): 2294-2296.
- [16] Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, et al. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing [J]. *Biochimie*, 2008, 90(4): 660-668.
- [17] Zhang JY, Nie YN, Chen CX, et al. Evaluation of PFGE and MLVA in molecular typing of *Salmonella typhimurium* isolated in China [J]. *Dis Surveill*, 2011, 26(4): 264-270. (in Chinese)  
张京云, 聂艳妮, 陈春霞, 等. 脉冲场凝胶电泳和多位点串联重复序列分析应用于中国鼠伤寒沙门菌分型能力的评价 [J]. *疾病监测*, 2011, 26(4): 264-270.
- [18] Chen JC, Fan FX, Wang SJ, et al. Characteristics of molecular typing for *Salmonella typhimurium* isolated in China from 2006 to 2010 [J]. *Chin J Zoonoses*, 2013, 28 (12): 1161-1166. (in Chinese)  
陈建才, 樊粉霞, 王淑京, 等. 2006-2010 年中国鼠伤寒沙门菌分子分型分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 28(12): 1161-1166.
- [19] Wuyts V, Mattheus W, de Bex GDL, et al. MLVA as a tool for public health surveillance of human *Salmonella typhimurium*: prospective study in Belgium and evaluation of MLVA loci stability [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84055.
- [20] Sintchenko V, Wang Q, Howard P, et al. Improving resolution of public health surveillance for human *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* infection: 3 years of prospective multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) [J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 78.
- [21] Broschat SL, Call DR, Davis MA, et al. Improved identification of epidemiologically related strains of *Salmonella enterica* by use of a fusion algorithm based on pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(11): 4072-4082.

(收稿日期: 2014-03-14)

(本文编辑: 张林东)