

细菌DNA分析在流行病学调查中的应用

舒 泉¹ 秦生巨² 综述 易八贤¹ 审校

细菌性传染病在流行病学调查中占有重要位置。对于病原菌的追踪、分型,人们根据其生物学特征建立了许多方法,如血清学、噬菌体分型、耐药谱的测定等。这些方法均无法回避下列缺点:①依赖于细菌表型。由于同株菌表型的表达,受到许多因素的限制,往往不能准确地表达,给准确鉴定菌株带来困难;②敏感度较低,通常无法区分同种菌的不同株。为克服这些不足,近年来,分子生物学技术广泛应用于流行病学调查〔1〕。本文综述细菌DNA分析技术应用近况。

质粒DNA分析

随着分子生物学技术的发展,质粒的分离和提取技术也逐渐发展起来。目前已发现携带质粒的细菌有葡萄球菌、链球菌、淋球菌、几乎整个肠菌科、假单胞杆菌、流感杆菌、军团杆菌、棒状杆菌、土壤杆菌和根瘤菌等。

一、质粒DNA分析技术及其应用: 琼脂糖凝胶电泳,限制性内切酶及DNA-DNA杂交技术目前已广泛用于流行病学调查〔1~11〕。流行菌株所含的质粒在一定的时间和地点范围内保持相对稳定。分子量不同的质粒,经琼脂糖凝胶电泳后,具有迁移率不同的谱带,据此可鉴别细菌。例如,徐润琳等〔2〕对引起院内感染的鼠伤寒沙门氏菌作质粒分析,结果表明流行菌株均含85Md质粒,而与流行无关的对照菌株含62Md质粒。有些分子量相同的质粒具有不同的碱基顺序;有的质粒在提取过程中受损,部分质粒的共价闭环(CCC)结构转变成开环(OC)或线状(L)结构,电泳后出现两条甚至三条谱带〔3〕。对于这些质粒可以用限制性内切酶及DNA-DNA杂交技术进行同源性分析,更精细地研究菌株之间的关系。此外,对细菌质粒CCC、OC、L型的区别,Hintermann等〔4〕建立了简便、快速的双向琼脂糖凝胶电泳方法。

质粒分析用于流行病学调查,敏感度、特异性较高,重复性好,分析周期短,一般无需特殊试剂。

肖黔林等〔5〕用质粒分析、噬菌体分型、药敏试验三种方法检查了贵州安顺地区1985年10月伤寒爆发流

行和1986年春季分离的伤寒沙门氏菌。其耐药谱较复杂,不易看出菌株之间的关系;噬菌体分型结果主要为M₁型,少部分菌株不被裂解,不能分型;质粒分型发现绝大部分流行菌株含100Md质粒,而从沙娥村分离的菌株不含100Md质粒,这同流行病学调查该地患者与其它各流行点无流行病学联系的推论相吻合。他们认为,质粒分析简便、细致;噬菌体分型麻烦,如无Vi抗原,则不能分型;药敏试验具有很大的局限性。于军等〔6〕的实验也证实了上述结论,并用限制性内切酶对三起均含64.5Md质粒的食物中毒鼠伤寒沙门氏菌作了酶切分析,发现在开封市引起食物中毒的两起菌株同源,其64.5Md质粒与另一起地理位置相隔较远的菌株的64.5Md质粒完全不同,且无流行病学联系。Clabots等〔7〕在1988年分析耐氯林可霉素的顽固梭状芽胞杆菌质粒时,流行菌株上均有迁移率不同的两条质粒带。用限制性内切酶分析发现这两条带具有相同的分子量,并且均能够与一分子量为3.1kb的已知质粒探针杂交,从而证实这两条带为同一质粒的CCC型及OC型。

质粒分析的应用,为一些至今未建立标准分型的鼠菌属(种)的流行病学调查提供了可能。例如美国弗吉尼亚医学院烧伤病房1976年和1982年发生两起阴沟肠杆菌引起的爆发流行。由于阴沟肠杆菌缺乏可靠的实验室分型方法,不能追踪。Markowitz等〔8〕通过质粒谱的比较,区分开了相隔6年由阴沟肠杆菌引起的两起医院内感染的菌株。

通过质粒分析来鉴定病原菌,具有许多优点。但也受一些限制,如菌株无质粒,有些质粒不稳定或经多次传代丢失及限于一定时间、地点。

二、质粒的流行病学: 质粒可以通过不同的遗传转移机制在不同细菌中传播,形成流行质粒。也可能遇到其它质粒、前噬菌体、染色体等DNA序列,经重组形成新的复制子。现在已知R质粒宿主范围广泛,可在多种菌属中传播〔9〕。由于大部分抗生素耐药性由R质粒所介导,因此,对R质粒的追踪有重要的流行病学

意义。1975~1976年,美国波士顿某医院发生一起由庆大霉素耐药质粒引起的爆发流行〔10〕。最初,该质粒在一株肺炎杆菌中发现,后来传递给大肠杆菌,接着又形成以灵杆菌为优势菌群的流行,最后,该质粒在肺炎杆菌、灵杆菌、产气肠杆菌、大肠杆菌、摩根氏杆菌和弗劳地枸橼酸杆菌等6个菌属8个血清型中检出。这一流行过程是通过质粒的EcoRI酶切分析而发现的。Rubens等〔11〕在分析引起医院内感染的耐庆大霉素革兰氏阴性菌时,从绿脓杆菌、肺炎杆菌及阴沟肠杆菌中发现了分子量为9.8、80、100、105、110Md的几种质粒,80和100Md质粒无庆大霉素耐药基因。经酶切及DNA-DNA杂交试验,发现庆大霉素耐药基因存在于9.8Md质粒上,105、110Md耐药质粒则是由9.8Md质粒插入100Md质粒演化而成。

染色体DNA分析

为克服质粒分析法及经典方法的不足,近年来,人们开始尝试直接通过细菌染色体DNA的分析来更精细地研究细菌。

一、染色体DNA限制性内切酶酶切谱:提纯的染色体DNA经限制性内切酶消化后,形成一系列DNA片段,通过凝胶电泳构成酶切图谱。根据染色体DNA酶切谱的相似程度,判断不同菌株的亲缘关系。同种细菌中不同菌株具有不同的酶切谱,同一菌株酶切谱相同或者非常相似。

过去对Lancefield C群链球菌的分类,鉴定主要依靠细菌素、噬菌体等方法,对动物流行性链球菌菌株通常无法区分。Skjold等〔12〕用染色体DNA酶切谱对从人和动物中分离的该菌株进行分析,来源不同的菌株酶切谱不同,同一次爆发流行菌株酶切谱一致。与部分菌株用细菌素、噬菌体分型的结果吻合;对不能用细菌素、噬菌体方法鉴定的菌株也能明确地区分。Khabbaz等〔13〕从同一病房分离的27株棒状杆菌属JK群菌,耐药谱相同,其中2株菌各含1分子量相同的质粒。通过酶切谱分析才阐明这些菌株间的差异,说明“病人-病人”传播方式的推论不能成立。

到目前为止,革兰氏阳性菌及革兰氏阴性菌均有酶切谱分析的报道〔12~18〕。这些实验表明,该方法容易开展,敏感度高,特别适合对同种菌的不同菌株的区别。可作为噬菌体、血清学等常规方法的补充。但由于经酶切后的DNA片段较多,酶切谱较复杂,肉眼观察较困难。

二、染色体探针指纹图:核酸探针杂交的着重点

在于酶切位点顺序的异源性的检测及酶切片段大小和长度的不同〔15〕,以此来区别不同的菌株。探针的运用,杂交谱带较少,易于观察,敏感度也有提高〔15~20〕。

Tompkins等〔15〕用Cosmid作载体,克隆肠炎沙门氏菌染色体DNA片段作成探针,用于几种沙门氏菌分析。从11个爆发区分离到的17株鼠伤寒沙门氏菌具有6个类型的探针指纹图。不同来源的大多数都柏林沙门氏菌探针指纹图不同,其中部分菌株的质粒谱和染色体酶切谱相同;9株来源不同,具有不同质粒谱的肠炎沙门氏菌中有8株具有相同的探针指纹图。他们的实验提示探针指纹图分析可区分用质粒谱及染色体DNA酶切谱无法区分的菌株;肠炎沙门氏菌经长期大范围的传播,质粒谱发生了明显的变化。

Rappuoli等〔16〕用新发现的白喉棒状杆菌染色体上的一段插入序列作探针,对在瑞士一次白喉爆发流行中分离的34株菌进行分析,其指纹图谱相同,从而推断这次流行为同一株菌引起。1972~1982年,美国西雅图白喉流行,涉及1100个病例,分为轻、中、重三型。Coyle等〔17〕用染色体酶切谱及attB、tox B、溶原性 β 噬菌体三个DNA探针指纹图分析了流行菌株。所有的中型菌株具有相同的酶切谱及探针指纹图,对照菌株的酶切谱相同,但有不同的探针指纹图。说明中轻型流行为同一菌株所致,未发生遗传变异。轻型菌株有5种以上酶切谱,而对照菌株呈同一谱型,提示在该次流行中,轻型由不同的细菌克隆所造成。25株重型菌中有22株酶切谱相同,8株对照菌具有7种明显不同的酶切谱;用探针分析发现流行菌株具有7种指纹图,其中5种具有复制的tox B片段及attB位点,这被认为在流行过程中有 β 噬菌体溶原化发生。其结果判断依据为:①染色体DNA酶切谱是判断菌株亲缘关系的主要标准;②酶切谱差异较大,判断为不同菌株;③具有相同或非常相似的酶切谱,但具有不同的attB、tox B、 β 噬菌体DNA探针指纹图,反映了同一株菌在流行过程中发生了变化。

Stull等〔18〕首次尝试了rRNA探针对不同种属细菌的分析。实验表明大肠杆菌rRNA探针与大肠杆菌、洋葱假单胞菌和流感嗜血杆菌的染色体DNA杂交,均有特征指纹图。由于rRNA基因在进化过程中高度保守,因而rRNA探针具有“广谱”的应用价值。为快速准确追踪流行菌株提供了广阔前景。

探针指纹图法有很多优点,但要广泛地用于流行病学调查,必须克服同位素标记物半衰期短,操作困难等

缺点〔18〕。因此,寻求非同位素标记物愈显重要。周勇太等〔19〕报道的生物素标记探针,用于空肠弯曲菌DNA杂交,敏感度及特异性与用³²P标记的探针无明显差别。用生物素标记探针不仅克服了同位素标记的缺点,而且简单易行,具有重要的实际意义。

参 考 文 献

- 1.王枢群. 流行病学进展. 北京: 人民卫生出版社, 1988 : 22.
- 2.徐润琳, 等. 一次新生儿病房鼠伤寒沙门氏菌的院内感染调查报告. 医院感染管理1988; (3) : 83.
- 3.Gonzalez JM, et al. Patterns of plasmid DNA in Crystalliferous and AcrySTALLiferous strains of *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* 1980; 3 : 92.
- 4.Hintermann G, et al. Simple procedure for distinguishing CCC, OC and L forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* 1981; 5 : 371.
- 5.肖黔林, 等. 质粒分析、噬菌体定型及耐药谱测定在伤寒流行病学调查中的应用. 中华流行病学杂志 1987; 8 : 272.
- 6.于军, 等. 五起鼠伤寒沙门氏菌病爆发菌株质粒谱指纹图谱分析. 中华微生物学和免疫学杂志1986; 6(4) : 193.
- 7.Clabots CR, et al. Characterization of a nosocomial *Clostridium difficile* outbreak by using plasmid profile typing and clindamycin susceptibility testing. *J Infect Dis* 1988; 158 : 731.
- 8.Markowitz SM, et al. Sequential outbreaks of infection due to *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: implication of a conjugative R plasmid. *J Infect Dis* 1980; 142 : 106.
- 9.Datta N, et al. Host ranges of R factor. *J Gen Microbiol* 1972; 70 : 453.
- 10.O'Brien TF, et al. Dissemination of an antibiotics resistance plasmid in hospital patient flora. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17 : 537.
- 11.Rubens CE, et al. Evolution of a plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents during a prolonged epidemic of nosocomial infections. *J Infect Dis* 1981; 143 : 170.
- 12.Skjold SA, et al. DNA fingerprinting of *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C) as an aid to epidemiological study. *J Infect Dis* 1987; 155 : 1145.
- 13.Khabbaz RF, et al. Molecular epidemiology of group JK *Corynebacterium* on a cancer ward: lack of evidence for patient-to-patient transmission. *J Infect Dis* 1986; 154 : 95.
- 14.Kaper JB, et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* in the US Gulf Coast. *J Clin Microbiol* 1982; 16 : 129.
- 15.Tompkins LS, et al. Cloned, random chromosomal sequences as probes to identify *Salmonella* species. *J Infect Dis* 1986; 154 : 156.
- 16.Rappuoli R, et al. Molecular epidemiology of the 1984-1986 outbreak of diphtheria in Sweden. *N Engl J Med* 1988; 318 : 12.
- 17.Coyle MB, et al. The molecular epidemiology of three biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* in the Seattle outbreak, 1972-1982. *J Infect Dis* 1989; 159 : 670.
- 18.Stull TL, et al. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *J Infect Dis* 1988; 157 : 280.
- 19.周勇太, 等. 生物素标记弯曲菌DNA探针的研究. 中华微生物学和免疫学杂志1988; 8 : 162.
- 20.Ogle JW, et al. Characterization and use of a DNA probe as an epidemiological marker for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1987; 155 : 119.

125A