

# 江西省钩端螺旋体分离株脉冲场凝胶电泳分型和分析

徐建民 蒋秀高 李秀文 张艳 王健 熊长辉

**【摘要】** 目的 采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术,对江西省钩端螺旋体(钩体)患者及动物宿主中分离的钩体菌株型别进行分子流行病学调查。方法 利用核酸内切酶 *Not I* 对提取的钩体菌株染色体 DNA 进行酶切,通过 PFGE 将 DNA 片段分离。获得的 PFGE 图像采用分析软件 BioNumerics 4.0 进行处理并建立数字化数据库,以相似度 >75% 为标准,将获各钩体 PFGE 图谱与中国 15 群 15 型钩体参考标准株进行比较并进行聚类分析。结果 江西省不同地区的 139 株钩体可分为 46 个 PFGE 型,优势型为 *LepNot I. 0071*、*LepNot I. 0072* 和 *LepNot I. 0043* 型,分别占有钩体菌株的 28.06%、15.11% 和 7.19%。139 株钩体分离株中,84.89%(118/139) 菌株的 PFGE 图谱与 6 群 6 型中国钩体参考标准株基本相符,其中 32.37%(45/139) 钩体菌株属于黄疸出血群赖型,15.83%(22/139) 和 15.11%(21/139) 钩体菌株分别属于澳洲群澳洲型和爪哇群爪哇型。结论 PFGE 是一种快速、准确、高效的钩体分型方法。黄疸出血群赖型是江西省人群及动物中优势血清型,澳洲群澳洲型和爪哇群爪哇型位于其次。

**【关键词】** 钩端螺旋体;脉冲场凝胶电泳;分型;分子流行病学

**Molecular typing on *Leptospira interrogans* isolates from Jiangxi province, by pulsed-field gel electrophoresis** XU Jian-min<sup>1</sup>, JIANG Xiu-gao<sup>2</sup>, LI Xiu-wen<sup>2</sup>, ZHANG Yan<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, XIONG Chang-hui<sup>1</sup>. 1 Jiangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330029, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center Disease Control and Prevention Corresponding author: XU Jian-min, Email: jianminx@126.com

**【Abstract】** **Objective** To perform a molecular epidemiological investigation on the types of *Leptospira interrogans* isolates from leptospirosis patients and animal hosts in Jiangxi province, using a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Methods** The extracted chromosomal DNA from leptospiral isolates were digested with restriction endonuclease *Not I* and the DNA segments were separated by using PFGE. By BiOnumerics V4.0 software and 75% similarity as the standard, the obtained PFGE images from leptospiral isolates were managed to establish a digitization database and then the PFGE maps of leptospiral isolates were compared with those of reference standard strains belonging to 15 serovars in 15 serogroups of *L. interrogans*, for cluster analysis. **Results** 139 strains of *L. interrogans* isolated from different areas of Jiangxi province were classified into 46 PFGE types. Among the PFGE types, *LepNot I.0071*, *LepNot I.0072* and *LepNot I.0043* were the predominant types that accounting for 28.06%, 15.11% and 7.19% of all the leptospiral isolates, respectively. The PFGE maps from 84.89% (118/139) of the 139 leptospiral isolates were found to basically match those of 6 reference standard strains belonging to 6 serovar in 6 serogroups of *L. interrogans*. In the 118 matched leptospiral isolates, 32.37% (45 strains), 15.83% (22 strains) and 15.11% (21 strains) belonged to sero-groups Icterohaemorrhagiae serovar Lai, sero-groups Australis serovar Australis and sero-group Javanica serovar Javanica, respectively. **Conclusion** PFGE seemed a fast, accurate and effective method for typing of *L. interrogans* isolates. Serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai and followed by serogroup Australis serovar Australis as well as serogroup Javanica serovar Javanica were the predominant *L. interrogans* species in humans and animal hosts in Jiangxi province.

**【Key words】** *Leptospira interrogans*; Pulsed-field gel electrophoresis; Typing; Molecular epidemiology

脉冲场凝胶电泳(PFGE)是一种先进的分子遗传

学分型技术,近年来广泛应用于细菌等病原微生物分型及追溯传染源的分子流行病学调查中<sup>[1]</sup>。张艳等<sup>[2]</sup>通过实验研究,对钩端螺旋体(钩体)PFGE条件进行了优化,建立了钩体 PFGE 标准化操作程序,制作了中国 15 群 15 型 15 株钩体参考标准株的 PFGE 图谱,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.04.017

作者单位:330029 南昌,江西省疾病预防控制中心(徐建民、王健、熊长辉);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(蒋秀高、李秀文、张艳)

通信作者:徐建民,Email: jianminx@126.com

并通过BioNumerics软件建立了上述图谱资料的数字化数据库。江西省是钩体病高发地区,在2002—2008年钩体病监测中,从钩体患者及多种动物中分离出大量钩体菌株,由于受条件的限制,无法采用常规的血清学方法鉴定其血清群型。本研究参照张艳等建立的标准化操作程序,对139株钩体菌株进行PFGE分型分析。

### 材料与方 法

1. 菌株来源:139株钩体菌株分别于2002—2008年分离自江西省四个国家级钩体病监测点上饶县、龙南县、上高县、浮梁县以及省级钩体病监测点新建县钩体患者、多种钩体宿主动物及稻田水:其中从钩体患者中分离6株,从鼠肾中分离108株(黑线姬鼠53株、黄毛鼠30株、褐家鼠16株、黄胸鼠6株、小家鼠1株、鼯鼠2株)、犬肾中分离16株、牛肾中分离3株、黄鹿肾中分离1株、野猪肾中分离1株、青蛙肾中分离1株,另从稻田水中分离3株。

2. 主要试剂:限制性核酸内切酶*Not*I购自大连宝生物工程公司(TaKaRa),蛋白酶K购自德国MERCK公司。琼脂糖(SeaKem Gold)为美国BMA公司产品,溴化乙锭为美国Sigma公司产品。钩体EMJH培养基为美国BD公司产品,DNA Marker采用亚太地区PulseNet提供的沙门菌工程菌H9812经标准化方法提取的DNA及其*Xba*I酶切后的产物。

3. 主要仪器:冷冻离心机为KR 22i型(JOUAN,法国),比浊管为REF352054型(BD,美国),水浴摇床为OLS2000型(Grant,英国),细菌浊度仪为Densimat型(BioMerieux,法国),脉冲场凝胶电泳仪为CHEF DR III system型(Bio-Rad,美国),凝胶成像系统为Gel Doc 2000型(Bio-Rad,美国)。

4. 胶块制备:在EMJH培养基中28℃生长5~7d、经活菌计数菌体浓度达到 $2 \times 10^9$ /ml以上的钩体培养物12 000 r/min 4℃离心20 min。钩体沉淀用50 mmol/L EDTA、20 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl (pH值7.2)缓冲液重悬,6000 r/min离心5 min。取钩体沉淀再用上述缓冲液重复洗涤、离心1次后,调节菌浊度至4.0 McFarland。取400 μl菌液在50℃条件下与等量1% SeaKem Gold琼脂糖混匀,加入专用模具制作DNA凝胶块。将胶块转入终浓度为0.3 mg/ml蛋白酶K溶液中,50℃水浴中100 r/min轻摇作用2 h。50℃预热的纯水洗涤胶块2次,每次10 min,再用50℃预热的TE缓冲液洗涤胶块4次,每次15 min。

5. *Not*I酶切:从制备的大胶块中切出2 mm×2 mm

小胶块放入150 μl酶切缓冲液中,37℃水浴15 min。吸除酶切缓冲液,加入200 μl含限制性核酸内切酶*Not*I的新鲜酶切缓冲液,37℃酶切2 h以上或过夜。

6. 电泳和染色:取出酶切后的小胶块放入梳子齿上晾干,从胶槽下部倒入120 ml融化后55~60℃平衡的1% SeaKem Gold琼脂糖,室温放置30 min至琼脂糖完全凝固。将胶块放入已有0.5×TBE缓冲液的电泳槽中电泳,电压6 V/cm,初始脉冲5 s,终脉冲5~65 s,脉冲角度120°,电泳液恒温系统温度14℃,电泳时间20 h。电泳结束后,将胶块放入400 ml 1 μg/ml EB溶液中染色30 min,蒸馏水中脱色90 min。

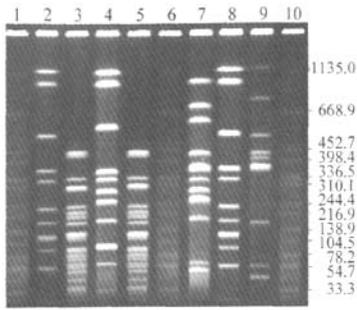
7. 读胶与数据分析:在凝胶成像仪上拍摄大小为640×480的胶块图像,获得的PFGE图像用分析软件BioNumerics 4.0进行处理,包括识别图像条带、导入菌株背景资料、建立图像数字化数据库等。聚类图类型采用加权配对算数平均法(UPGMA)进行构建,条带位置差异容许度1.0%,优化值0.5%,若出现不同的条带即判定为不同的型。不同菌株电泳条带的相似度用Dice系数( $F$ 值×100%)表示,其中 $F$ 值反映不同菌株电泳条带的相似性程度,范围在0~1之间,1表示完全相同,0表示完全不相关<sup>[3]</sup>。

8. 钩体PFGE分子分型命名规则:参照PulseNet命名规则,对不同的条带进行命名,命名格式为Lep*Not*I.XXXX,Lep是钩体的缩写,*Not*I是指使用的核酸内切酶为*Not*I,后四位是带型的编号。本研究的PFGE图谱由PulseNet China统一命名。

### 结 果

1. 钩体菌株PFGE型:139株钩体菌株经限制性内切酶*Not*I酶切及PFGE后,产生了不同带型的PFGE图谱,共分为46个PFGE型,部分菌株PFGE电泳图谱见图1。各PFGE型中,Lep*Not*I.0071型钩体菌株最多,占总菌株数的28.06%(39/139),其次为Lep*Not*I.0072型,占15.11%(21/139),再次为Lep*Not*I.0043型,占7.19%(10/139),该三型钩体菌株共占总菌株数的50.36%(70/139)。其余各PFGE型分别包含1~9株钩体菌株,31株钩体各有单一的PFGE型。

2. 钩体菌株PFGE谱型聚类分析:以相似性>75%作为同类株的判断标准,139株钩体菌株PFGE谱型与参考文献[2]中的PFGE谱相比,84.89%(118/139)菌株与中国主要流行的6群6型钩体代表株PFGE谱型基本相符。139株钩体菌株中,45株PFGE谱型与黄疸出血群赖型赖株(中国编号为56601)相似性为86%左右,包含4个带型,以Lep*Not*I.0071型



注: 1、6 和 10: DNA Marker; 2 和 8: *LepNot I.* .0043 型; 3 和 5: *LepNot I.* .0072 型; 4、7 和 9: 分别为 *LepNot I.* .0001、*LepNot I.* .0071 和 *LepNot I.* .0099 型

图 1 部分钩体菌株 PFGE 电泳图

为主; 22 株 PFGE 谱型与澳洲群澳洲型 65-9 株(国内编号 56607)相似性 > 75%, 包含 15 个带型; 21 株 PFGE 谱型与爪哇群爪哇型 M10 株(国内编号 56602)相似性高达 92%, 仅有 1 个 *LepNot I.* .0072 带型; 10 株 PFGE 谱型与犬群犬型株(国内编号 56603)相似性为 100%, 也仅有 1 个 *LepNot I.* .0043 带型。有 21 株钩体菌株 PFGE 谱型与中国各钩体参考标准株差异较大, 目前无法比对(表 1、2 和图 2)。

讨 论

钩体病是一种人畜共患的自然疫源性疾病, 目前中国已发现致病性钩体有 18 个血清群 75 个血清型。钩体常用的分类法为血清学分类和基因分类。血清学分类是以 O 抗原为主要靶抗原的分类法, 通过交叉凝集吸附试验将钩体分成不同血清型, 1954 年由 Wolff 和 Broom 建立该分类方法以来, 一直在全世界范围内被广泛采用。然而, 交叉凝集吸附试验需要多种抗血清, 操作繁琐、耗时且难以实现标准化。随着分子生物学技术的发展和微生物基因组测序工作的进展, 近年国际上在细菌分类学中出现了以基因序列为基础的分型方法, PFGE 图谱分析是其中较为常用的方法之一。

Herrmann 等<sup>[4]</sup>于 1992 年将 PFGE 用于钩体分型, 结果显示 88.89%(64/72)钩体菌株 PFGE 图谱分析结果与血清学分型结果一致。Galloway 和 Levett<sup>[5]</sup>于 2008 年用改进的 PFGE 法检测 206 株钩体, 也有

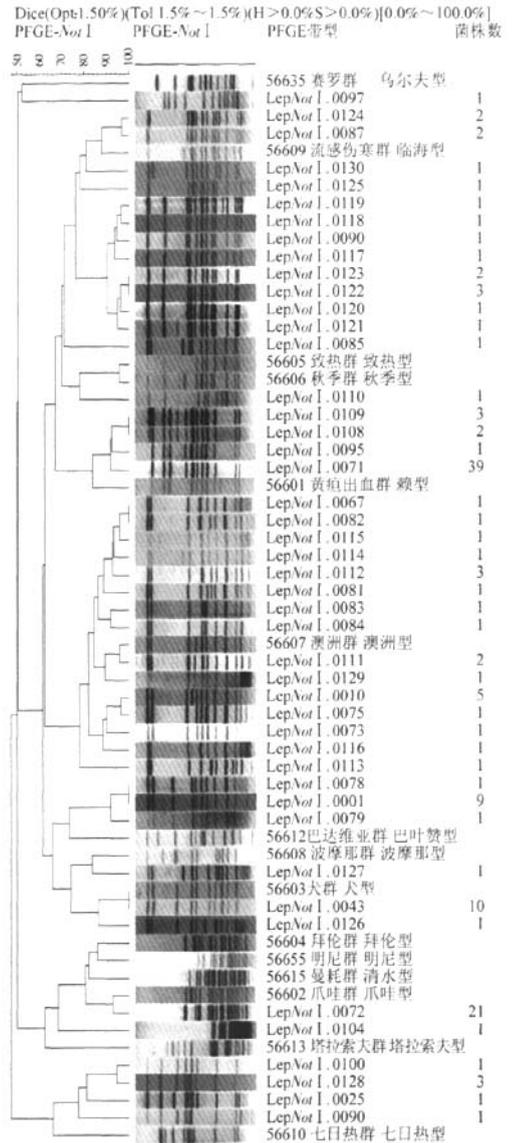


图 2 江西省 46 个 PFGE 型钩体与代表株聚类图

88.83%(183/206)钩体菌株的 PFGE 分类与血清学分类结果一致。蒋秀高等<sup>[6]</sup>于 2001 年采用 PFGE 法检测了中国 15 群 15 型 15 株钩体参考标准株, 发现各参考标准株 PFGE 图谱各具特征性。本研究用于 PFGE 分类的 139 株钩体菌株中, 84.89%(118/139)菌株的 PFGE 图谱与中国 6 群 6 型钩体参考标准株相符, 与上述国外学者 PFGE 分型结果相近。实验

表 1 139 株钩体菌株与中国钩体参考标准株 PFGE 聚类结果构成(相似性 ≥ 75%)

血清群型	病例	黑线姬鼠	黄毛鼠	褐家鼠	黄胸鼠	小家鼠	鼯鼠	犬	牛	野猪	黄鹿	青蛙	稻田水	合计
黄疸出血群赖型	1	33	6	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	44
爪哇群爪哇型	-	1	12	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
犬群爪哇	1	1	1	-	-	-	-	6	2	-	1	-	-	12
秋季群秋季型	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
澳洲群澳洲型	-	-	8	4	2	1	-	6	1	-	-	-	-	22
流感伤寒群临海型	1	9	2	-	1	-	2	1	-	-	-	1	-	17
未知	3	8	1	1	2	-	-	3	-	1	-	-	3	22
合计	6	53	30	16	6	1	2	16	3	1	1	1	3	139

表 2 病例、动物、环境中钩体分离株与中国标准钩体血清群型 PFGE 聚类结果

钩体参考标准株(菌号)	血清群	血清型	PFGE 型	构成比 (%)
56601	黄疸出血	赖	45	32.37
56602	爪哇	爪哇	21	15.11
56603	犬	犬	12	8.63
56604	拜伦	拜伦	-	-
56605	致热	致热	-	-
56606	秋季	秋季	1	0.72
56607	澳洲	澳洲	22	15.83
56608	波摩那	波摩那	-	-
56609	流感伤寒	临海	17	12.23
56610	七日热	七日热	-	-
56635	赛罗	乌尔夫	-	-
56655	明尼	明尼	-	-
56612	巴达维亚	巴叶赞	-	-
56613	塔拉索夫	塔拉索夫	-	-
56615	曼耗	清水型	-	-
其他	-	-	21	15.11

中还发现, PFGE 技术应用于钩体分型具有快速、分辨力强、重复性好、结果稳定等优点。

不同血清群可显示不同的 PFGE 带型特点, 同一血清群钩体 PFGE 谱型相似性则明显较高。辛晓芳等<sup>[7]</sup>于 2001 年发现, PFGE 图谱能有效分辨中国流感伤寒群不同血清型钩体参考标准株。秦进才等<sup>[8]</sup>于 2004 年报道, 传统的血清学分类法与 PFGE 法鉴定新血清型钩体的结果完全一致。此次检测中, 属于黄疸出血群赖型的 45 株钩体菌株 PFGE 谱型相似性可达 86% 左右, 属于爪哇群爪哇型的 21 株钩体菌株 PFGE 谱型相似性更高达 92%, 属于澳洲群澳洲型的 22 株钩体菌株相似性虽仅 >75%, 且有 15 个 PFGE 带型, 但也有 1~2 个条带的差异(图 2)。此外, 本研究中 10 株与中国犬群犬型株(中国编号 56603) PFGE 谱型完全相似的钩体菌株, 是不同地区和不同时间分别分离自犬肾(7 株)、鼠肾(1 株)、黄鹿肾(1 株)和钩体患者(1 株)的不同标本。上述资料表明, PFGE 用于钩体分型有较高特异性, 其分型结果不仅能与血清学分类相吻合, 还可体现钩体基因的多态性并有利遗传分类学鉴定。

本实验发现, 尽管江西省不同地区钩体患者或动物中分离的同一血清型钩体菌株有相似的 PFGE 谱型, 但同一地区分离的钩体菌仍有其特定流行的 PFGE 带型。例如, *LepNot* I.0071 型主要分布在上饶县及浮梁县; *LepNot* I.0072 型主要分布在龙南县, 新建县也有少量分布; *LepNot* I.0043 型主要分布在上高县。在钩体动物宿主中, 鼠类数量庞大, 猪、牛和犬等家畜与人类关系密切, 因而是人类感染钩体的主要传染源。其中黑线姬鼠带菌率高, 是引起中国稻田型钩体病流行的主要动物宿主, 其携带的主要钩体菌群为黄疸出血群, 具有很强的致病力<sup>[9]</sup>。郭宗

琪等<sup>[10]</sup>采用 PFGE 法分析黑线姬鼠携带的钩体菌群, 对判断钩体病传染源和监测有重要价值。本研究从鼠肾分离的 108 株钩体菌株中, 49.07% (53/108) 来自黑线姬鼠(表 2), 其中 64.15% (34/53) 黑线姬鼠来源的钩体菌株 PFGE 谱型为黄疸出血群赖型, 主要带型为 *LepNot* I.0071 型, 在钩体 PulseNet China 数据库中显示为江西省特有的黄疸出血群赖型谱型。

本研究中 15.11% (21/139) 的钩体菌株 PFGE 谱型与中国 15 群 15 型 15 株参考标准株代表株差异较大, 无法确认其血清型, 这与中国钩体 PulseNet China 数据库建立时间不长, 数据库中钩体代表株 PFGE 图谱数量不足有关。

参 考 文 献

- [1] Wang LL, Xu JG. Application Status of Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in molecular typing. *Dis Surveill*, 2006, 21(5): 1276-1279. (in Chinese) 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状. *疾病监测*, 2006, 21(5): 1276-1279.
- [2] Zhang Y, Guo ZQ, Li XW, et al. Establishment of standardized method for Pulsed-field gel electrophoresis on *Leptospira interrogans* and analysis on their patterns. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(8): 772-775. (in Chinese) 张艳, 郭宗琪, 李秀文, 等. 钩端螺旋体脉冲场凝胶电泳标准化技术的建立及谱型特征初步分析. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(8): 772-775.
- [3] Adhami EW, Roberts LA, Vickery B, et al. Epidemiological analysis of a methicillin — resistant *Staphylococcus aureus* outbreak using restriction fragment length polymorphisms of genomic DNA. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 2713-2720.
- [4] Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, et al. Pulsed-field gel electrophoresis of *Not* I digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 1696-1702.
- [5] Galloway RL, Levett PN. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78: 628-632.
- [6] Jiang XG, Xiao YC, Nie YX, et al. Identification of *Leptospira interrogans* by pulsed-field gel electrophoresis. *Chin J Microbiol Immunol*, 2001, 21(4): 378-381. (in Chinese) 蒋秀高, 肖玉春, 聂一新, 等. 致病性钩端螺旋体脉冲场凝胶电泳图谱分型研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21(4): 378-381.
- [7] Xin XF, Jiang XG, Qin JC, et al. Antigenic analysis of different reference strains of grippityphosa serogroup and identification of leptospiral strains. *Chin J Zoonoses*, 2001, 17(5): 83-85. (in Chinese) 辛晓芳, 蒋秀高, 秦进才. 流感伤寒群钩端螺旋体各型参考菌株的抗原分析及待检菌株的检定. *中国人兽共患病杂志*, 2001, 17(5): 83-85.
- [8] Qin JC, Chen MH, Jiang XG, et al. A new serovar in serogroup Manhao of leptospira interrogans—Serovar Heyan. *Chin J Zoonoses*, 2004, 20(6): 474-476. (in Chinese) 秦进才, 陈明华, 蒋秀高, 等. 曼耗群钩端螺旋体的一个新血清型——贺岩型. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(6): 474-476.
- [9] Yan J, Dai BM, Yu ES. *Leptospirosis*. 3rd edition, Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 155-193. (in Chinese) 严杰, 戴保民, 于恩庶. 钩端螺旋体病学. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 155-193.
- [10] Guo ZQ, Huang ZY, Chen N, et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* from Sichuan province by pulsed-field gel electrophoresis. *J Prev Med Inf*, 2007, 23(6): 644-646. (in Chinese) 郭宗琪, 黄自英, 陈娜. 四川省致病性钩端螺旋体脉冲场电泳分型分析. *预防医学情报杂志*, 2007, 23(6): 644-646.

(收稿日期: 2009-09-07)  
(本文编辑: 万玉立)