

上海市16个冷却塔水中军团菌脉冲场凝胶电泳分型及基因型监测

陈明亮 王刚毅 陈敏 周海健 邵祝军 张曦 吴凡

【摘要】 目的 研究上海市公共场所16个空调冷却塔水中军团菌的脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型,并连续监测该菌基因型变化。方法 2007年5—10月连续6个月以每月1次的频率采样,从16个公共场所空调冷却塔水中分离军团菌,经血清学凝集试验、胶乳凝集试验分型后,使用PFGE技术对酶切后的军团菌全染色体DNA进行电泳获得指纹图谱,利用BioNumerics软件进行聚类分析。结果 16个冷却塔水中共分离出131株军团菌,包括嗜肺军团菌、博杰曼军团菌、米克戴德军团菌和茴香军团菌,分为52个PFGE型别,其中37个PFGE型别(71.15%)仅分布于1个冷却塔中,即为该冷却塔所特有;15个PFGE型别(28.85%)分布于2个或以上冷却塔中。16个冷却塔具有2个或以上的PFGE型,13个冷却塔(81.25%)中多次出现相同的PFGE型别。2007年6—10月连续5个月从6个冷却塔中分离出18株PFGE型为LPAs.SH0078型的军团菌。结论 冷却塔水中的军团菌基因型具有多样性和复杂性,81.25%的冷却塔水中PFGE型具有持续性,且LPAs.SH0078型广泛分布,可能为优势PFGE型。

【关键词】 军团菌;脉冲场凝胶电泳;基因型;冷却塔

Genotypic variability and persistence of *Legionella* pulsed-field gel electrophoresis patterns in 16 cooling towers in Shanghai, China CHEN Ming-liang¹, WANG Gang-yi¹, CHEN Min¹, ZHOU Hai-jian², SHAO Zhu-jun², ZHANG Xi¹, WU Fan¹. 1 Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: WU Fan, Email: fwu@scdc.sh.cn; ZHANG Xi, Email: xzhang@scdc.sh.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Specific Projects of China (No. 2008ZX10004-002).

【Abstract】 Objective To investigate the genotypic characteristics and persistence of *Legionella* pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns in 16 air-conditioner cooling towers in six different public sites of Shanghai. Methods From May to October, continuous sampling was operated once per month in 2007. *Legionella* strains isolated from the 16 cooling towers were confirmed by serological and latex agglutination. PFGE was applied for the fingerprinting of the isolates, while the cluster results of PFGE were analyzed by BioNumerics software. Results 131 strains of *Legionella* were isolated, including *L. pneumophila*, *L. bozemanae*, *L. micdadei* and *L. anisa*. 52 distinguishable PFGE patterns were differentiated among the 16 cooling towers, with 37 patterns were owned by just one cooling tower, which was not shared with other cooling towers, while 15 patterns were shared by more than 2 cooling towers. All the cooling towers had ≥ 2 PFGE patterns, while in 13 cooling towers the same PFGE patterns were recovered during the six months. From June to October of 2007, 18 strains of *Legionella* belonging to the PFGE pattern of LPAs.SH0078 were isolated continuously from 6 cooling towers. Conclusion This study demonstrated great genotypic diversity and complexity of *Legionella* in cooling towers. Persistence of the PFGE patterns was observed in 81.25% of the cooling towers. The PFGE pattern of LPAs.SH0078 was distributed widely, suggesting it might be the dominate strain in Shanghai.

【Key words】 *Legionella*; Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE); PFGE pattern; Cooling towers

军团菌广泛分布于各种水系统中,尤其是空调

冷却塔水系中,这可能与军团菌病的暴发相关^[1,2]。脉冲场凝胶电泳(PFGE)常被应用于该类暴发中临床分离株和环境分离株的基因分型^[3,4],以及对冷却塔水中军团菌的监测。本研究通过对上海地区6种不同场所16个空调冷却塔连续监测,揭示军团菌在空调冷却塔中的基因型分布及其持续性。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.012

基金项目:国家科技重大专项(2008ZX10004-002)

作者单位:200336 上海市疾病预防控制中心(陈明亮、王刚毅、陈敏、张曦、吴凡);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(周海健、邵祝军)

通信作者:吴凡,Email:fwu@scdc.sh.cn;张曦,Email:xzhang@scdc.sh.cn

材料与amp;方法

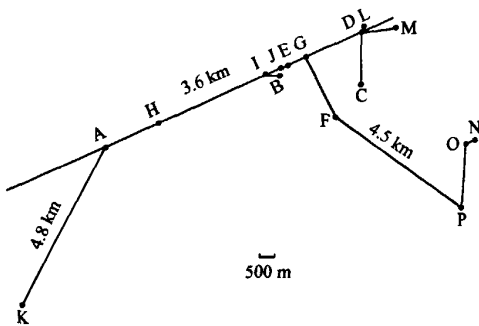
1. 材料:

(1) 采样地点和菌株: 所有的军团菌株均为 2007 年 5—10 月连续 6 个月以每月采样 1 次的频率, 从上海市 6 种公共场所(宾馆、大厦、地铁、酒店、商场和医院) 16 个中央空调冷却塔的冷却水和冷冻水中分离(表 1)。该 16 个冷却塔位于一个半径约 7 km 的区域内, 各塔间距离 130 m 至 14 km 不等(图 1)。

表 1 上海市不同公共场所 16 个冷却塔分离的军团菌株数和血清分型

冷却塔	场所	样品类型	菌株数	血清型
A	宾馆 I	C	6	Lp1/Lp6/L. bozemanæ
B	宾馆 II	C/F	6	Lp1/L. bozemanæ
C	大厦 III	C	11	Lp6/Lp7
D	地铁 I	C	6	Lp1/Lp7
E	地铁 II	C/F	7	Lp1/Lp6
F	酒店 I	C/F	17	Lp1/Lp3/Lp5/Lp7/Lp8/L. bozemanæ/nontypable
G	酒店 II	C/F	11	Lp1/Lp6/Lp8/nontypable
H	酒店 III	C	7	Lp1/Lp3
I	酒店 IV	C/F	7	Lp1/L. anisa
J	酒店 V	C/F	5	Lp1/Lp6
K	酒店 VI	C	6	Lp1/Lp8
L	酒店 IX	C	5	Lp1/Lp6/Lp8
M	商场 II	C	8	Lp1/Lp8/L. bozemanæ/L. micdadei
N	医院 I	C	11	Lp1/L. micdadei
O	医院 III	C	8	Lp1
P	医院 IV	C	10	Lp1/Lp6/L. bozemanæ

注: C 冷却水(cooling water), F 冷冻水(frozen water)



注: A—P 代表各冷却塔

图 1 上海市军团菌监测的 16 个冷却塔之间距离示意图

(2) 主要试剂和仪器: 军团菌诊断血清购自日本生研会社, 胶乳凝集试剂盒购自英国 OXOID 公司, 均在有效期内使用; 含 L-半胱氨酸 BCYE 平板和 GVPC 平板购自法国 BioMérieux 公司; Xba I 和 Asc I 限制性内切酶购自英国 New England Biolabs 公司; 蛋白酶 K 购自瑞士 Roche 公司; SeaKem Gold

Agarose 购自美国 Cambraex Bio Rockland 公司。主要仪器包括脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad CHEF Mapper)、凝胶成像仪(Bio-Rad GEL Doc2000)、菌液比浊仪(Siemens Healthcare Diagnostics Dade Microscan Turbidity Meter)、水浴摇床(Precision)、CO₂水巢式培养箱(Formar Scientific)等。

2. 实验方法:

(1) 军团菌的分离: 从冷却塔中采集水样 1 L, 采用孔径为 0.45 μm 的醋酸纤维素膜(Millipore)进行过滤浓缩。取 4 块 GVPC 平板(BioMérieux)接种 4 种不同方法处理的样品: ①酸处理后的未浓缩水样; ②浓缩后未经处理的水样; ③酸处理后的浓缩水样; ④热处理后的浓缩水样。平板接种后置 36 °C 有充足 CO₂ 的湿润环境中培养 10 d, 菌株经革兰染色和对 L-半胱氨酸的营养需求进行军团菌鉴定。采用军团菌诊断血清(Denka Seiken)和胶乳凝集试剂盒(OXOID)进行菌株分型。

(2) PFGE: 该方法由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所呼吸道传染病室提供^[5]。主要是将军团菌制成细菌悬液, 使用菌液比浊仪测量细菌浓度, 使其数值为 0.45。制成胶块之后, 用刀片切下约 2 mm 宽的胶块, 加入 50 U 的 Asc I 于 37 °C 酶切 3 h。电泳参数为: 电泳起始转换时间 6.8 s, 最后转换时间 54.2 s, 电压 6 V/cm, 电场夹角 120°, 电泳时间为 19 h。电泳结束后用 EB(ethidium bromide)染色, 去离子水脱色后在凝胶成像仪上照相。

(3) 聚类分析: 使用 BioNumerics 软件(Version 6.0, Applied Maths)对实验菌株全染色体 DNA 酶切图谱进行聚类分析, 选用 Dice 系数来估算菌株彼此之间的相似性, 聚类图类型选择 UPMGA(unweighted pair group method with arithmetic averages)方法, 然后根据 Tenover 等^[6]原则判别不同的 PFGE 型, 即只要有 1 个或更多条带不同, 则判定为不同的 PFGE 型别。

结 果

1. 菌株血清分型: 16 个冷却塔水样中共分离出 131 株军团菌, 其中 120 株为嗜肺军团菌(L. pneumophila), 6 株为博杰曼军团菌(L. bozemanæ), 2 株为米克戴德军团菌(L. micdadei), 1 株为茴香军团菌(L. anisa), 还有 2 株由于自凝为不可分型(nontypable)。在 16 个冷却塔中, 有 8 个冷却塔分离出一种军团菌(嗜肺军团菌), 6 个冷却塔分离出两种军团菌, 2 个冷却塔同时分离出三种军团菌。只

有 1 个冷却塔分离的菌株是由一种血清型(Lp1 型) 构成(表 1)。(表 2)。

讨 论

2. 菌株 PFGE 电泳图谱的聚类分析: 将 131 株军团菌菌株制备全染色体 DNA, 经限制性内切酶 Asc I 消化后进行 PFGE, 其全染色体 DNA 酶切图谱经 BioNumerics 软件进行聚类分析, 共分为 52 个 PFGE 型别(图 2)。

有研究显示约 8% ~ 13% 的社区获得性肺炎是由军团菌引起^[7]。军团菌在供水系统和空调系统中较为常见, 因此这些系统中的军团菌可能是引起军团菌病的潜在传染源^[8,9]。PFGE 已应用于对冷却塔水中军团菌的监测^[3,10]。根据已有报道^[11,12], 国内研究多采用某一时间点对多个场所的冷却塔予以采样进行菌株分子分型的方式, 因此仅具有横断面研究的资料; 而国际上多采用连续数年进行定期采样的方式对嗜肺军团菌进行分子分型, 这对流行病学调查结果的判定具有指导意义^[3]。

3. 冷却塔与菌株 PFGE 型别的关系: 16 个冷却塔分离的菌株共有 52 个 PFGE 型别, 其中 1 个(6.25%)冷却塔有 2 个 PFGE 型别, 2 个(12.50%)冷却塔有 3 个 PFGE 型别, 3 个(18.75%)冷却塔有 4 个 PFGE 型别, 4 个(25.00%)冷却塔有 5 个 PFGE 型别, 2 个(12.50%)冷却塔有 6 个 PFGE 型别, 2 个(12.50%)冷却塔有 7 个 PFGE 型别, 1 个(6.25%)冷却塔有 8 个 PFGE 型别, 1 个(6.25%)冷却塔有 9 个 PFGE 型别。

本研究对上海市不同公共场所 16 个中央空调冷却塔进行连续 6 个月监测, 从冷却水和冷冻水中共分离出 131 株军团菌 52 个 PFGE 型。大部分菌株间相似性系数差异明显, 其中有 18 株军团菌属于同一 PFGE 型, 为 LPAs.SH0078 型, 该型分布于 6 个不同的冷却塔, 各塔间相互距离为 130 m 至 8.5 km。提示上海市中央空调冷却塔水中军团菌存在广泛的遗传多样性, 而 LPAs.SH0078 型可能为其优势 PFGE 型。

4. 菌株 PFGE 型别分布: 分析 52 个 PFGE 型别在 16 个冷却塔中的分布, 发现 37 个(71.15%)PFGE 型别仅分布于 1 个冷却塔中, 即为该冷却塔所特有; 7 个(13.46%)PFGE 型别分布于 2 个冷却塔中(两塔间距离 300 m 至 5.9 km), 5 个(9.62%)PFGE 型别分布于 3 个冷却塔(各塔间距离 300 m 至 13.3 km), 3 个(5.77%)PFGE 型别分布于 6 个冷却塔(各塔间距离 130 m 至 10 km)。

本研究中 16 个冷却塔有 8 个分离的菌株是由两种或三种军团菌组成, 可见军团菌血清型组成具有多样性; 16 个冷却塔具有 52 个 PFGE 型, 且所有的冷却塔皆具有两个或以上的 PFGE 型, 表明该 16 个冷却塔的军团菌 PFGE 型别组成也具有多样性。

5. 冷却塔中 PFGE 型别的持续性: 对 16 个冷却塔进行 6 个月(5—10 月)的 PFGE 型别分析, 其中 13 个(81.25%)冷却塔多次出现相同的 PFGE 型别

表 2 上海市 16 个冷却塔不同月份分离的军团菌 PFGE 型别

冷却塔	月 份						是否出现过相同的 PFGE 型别
	5	6	7	8	9	10	
A	-	AA	AB	AB/AC	AB/AD	-	是(AB ^a)
B	BA/BB	BC	BD	BE	-	-	否
C	CA	-	AB/CB	AB	AB/CB	AB/CB	是(AB/CB ^b)
D	CB/DA	-	DB	-	-	DB	是(DB ^c)
E	-	AB/EA	AB/EA	AB	-	-	是(AB/EA ^d)
F	BE/CB/FA	BC	BE/EA/FB/FC/FD/FE	BE	-	-	是(BE ^e)
G	AA/EA	AB/GA/GB/GC/GD	GA/GC	-	-	-	是(GA/GC ^f)
H	HA	EA/HA/HB	EA	HC	EA	-	是(EA/HA ^g)
I	HC/IA	HC	EA	-	IB	IC	是(HC ^h)
J	JA	JB	AB/JC	AB	-	-	是(AB ⁱ)
K	-	KA	JB	KA	KB/KC	KD	是(KA ^j)
L	-	-	AB/LA/LB	-	-	AA/LC	否
M	-	-	FA	BE/JA	BE/DB/JA	JB/MA	是(BE/JA ^k)
N	-	AA/NA/DB	NB	NA/NC	ND/NE	-	是(NA ^l)
O	-	-	LA/OA/OB	AA/NA/NC	-	ND/OC	否
P	-	-	EA/NA/PA	AA/NA/PB	NA/PC/PD	NA	是(NA ^m)

注: ^aAB: LPAs.SH0078 型; ^bCB: LPAs.SH0051 型; ^cDB: LPAs.SH0011 型; ^dEA: LPAs.SH0056 型; ^eBE: LPAs.SH0042 型; ^fGA: LPAs.SH0058 型; ^gGC: LPAs.SH0067 型; ^hHA: LPAs.SH0065 型; ⁱHC: LPAs.SH0064 型; ^jKA: LPAs.SH0036 型; ^kJA: LPAs.SH0020 型; ^lNA: LPAs.SH0033 型

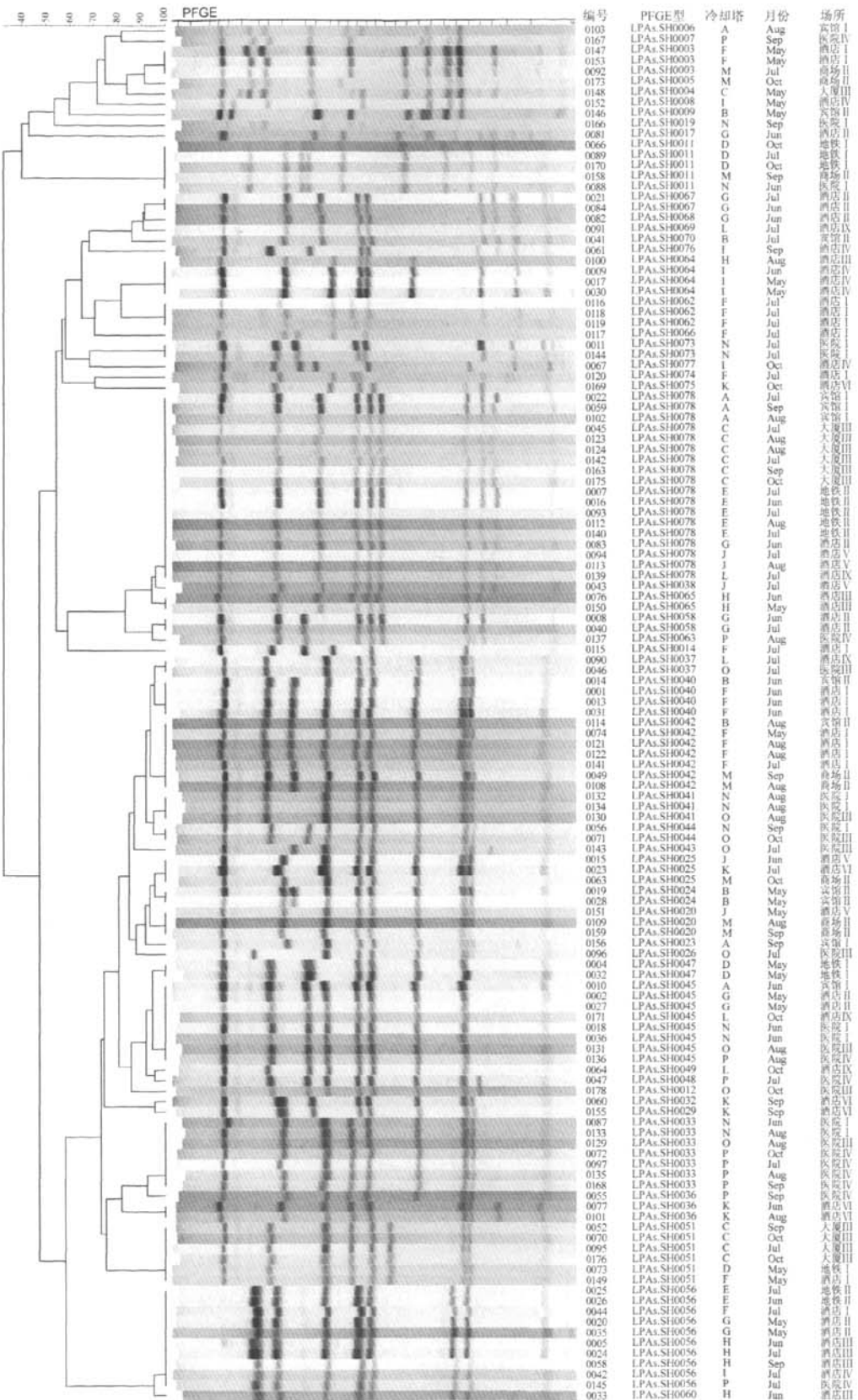


图2 上海市16个冷却塔分离的131株军团菌PFGE结果聚类图

对菌株 PFGE 型别在冷却塔中的分布进行分析,发现有 37 个(71.15%)PFGE 型别仅分布于 1 个冷却塔中,即为该冷却塔所特有,即使相距仅有 132 m 的另 2 个冷却塔却有其他 PFGE 型;此外,有 15 个(28.85%)PFGE 型别分布于 2 个或以上冷却塔中,即使相距达 13.3 km 的另两座冷却塔亦有相同的 PFGE 型。由此可见环境水样中军团菌基因型的多样性和复杂性^[3,8,13]。

有研究认为,水供给系统中的军团菌能够长期存在同一 PFGE 型,时间跨度可达 17 年^[8],而冷却塔水系中亦有同一 PFGE 型存在长达 5 年的报道^[3],值得注意的是,军团菌能够长期持续存在于水系中的 PFGE 型与其感染密切相关^[8]。因此对于能够持续从冷却塔中检出的 PFGE 型,需要特别关注。本研究对冷却塔中军团菌的 PFGE 型别进行持续性监测,并比较不同月份冷却塔中军团菌的 PFGE 型,发现有 13 个(81.25%)冷却塔多次出现相同的 PFGE 型别,尤其是 LPAs.SH0078 型,从 2007 年 6—10 月连续 5 个月从 6 个冷却塔中分离出 18 株该 PFGE 型军团菌,该基因型在 4 座冷却塔中持续出现,提示该型可能为上海市中央空调冷却塔水中的优势 PFGE 型,应警惕该型军团菌引起的感染病例。

参 考 文 献

- [1] Formica N, Tallis G, Zwolak B, et al. Legionnaires' disease outbreak: Victoria's largest identified outbreak. *Commun Dis Intell*, 2000, 24: 199-202.
- [2] Fernandez JA, Lopez P, Orozco D, et al. Clinical study of an outbreak of legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002, 21: 729-735.
- [3] Sanchez I, Garcia-Nunez M, Ragull S, et al. Genotypic variability and persistence of *Legionella pneumophila* PFGE patterns in 34 cooling towers from two different areas. *Environ Microbiol*, 2008, 10: 395-399.
- [4] Sabria M, Yu VL. Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2: 368-373.
- [5] Zhou H, Ren H, Zhu B, et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(5): 1334-1340.
- [6] 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: 2233-2239.
- [7] Braun JJ, de Graaff CS, de Goey J, et al. Community-acquired pneumonia: pathogens and course in patients admitted to a general hospital. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2004, 148: 836-840.
- [8] Garcia-Nunez M, Sopena N, Ragull S, et al. Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial legionnaires' disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, 52: 202-206.
- [9] Den Boer JW, Bruin JP, Verhoef LP, et al. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14: 459-466.
- [10] Ragull S, Garcia-Nunez M, Pedro-Botet ML, et al. *Legionella pneumophila* in cooling towers: fluctuations in counts, determination of genetic variability by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and persistence of PFGE patterns. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 5382-5384.
- [11] Yuan YM, Yuan M, Yu MH. Analysis of fingerprinting of *Legionella pneumophila* serogroup I strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Chin Trop Med*, 2008, 8: 889-890. (in Chinese) 袁月明,袁梦,俞慕华. 深圳市嗜肺军团菌血清 I 型菌株 PFGE 分型指纹图谱研究. *中国热带医学*, 2008, 8: 889-890.
- [12] Zhang Z, Zhu SR, Xu BX. Study on gene detection and molecular characteristics of *Legionella pneumophila*. *Chin J Health Lab Tech*, 2007, 17: 1978-1980. (in Chinese) 张政,朱水荣,徐宝祥. 嗜肺军团菌基因检测及分子特征研究. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17: 1978-1980.
- [13] Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, et al. Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 2652-2655.

(收稿日期:2010-03-05)

(本文编辑:张林东)