

肺炎克雷伯菌脉冲场凝胶电泳及多位点序列分型技术的联合应用

高源 张砾 李马超 黄成 任红宇 周海健 朱兵清 李倩 王晓蕾 邵祝军

【摘要】 目的 联合使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)及多位点序列分型(MLST)对肺炎克雷伯菌进行分型研究。方法 参照美国疾病预防控制中心及亚太地区 PulseNet 提供的 PFGE 相关标准化操作程序,优化相关电泳条件,对某儿童医院于 2005—2006 年分离到的 59 株菌分型分析,对其中心高度相似性菌株进行 MLST 分型分析。结果 59 株菌经 PFGE 分型分析,可分成 47 个 PFGE 型,19 个 PFGE 群,具有高度相似性的菌株经 MLST 分型,其型别分别为 ST-340、ST-342、ST-343、ST-344、ST-345,其中 ST-342、ST-343、ST-344、ST-345 为 MLST 数据库中中国新发现的 ST 型。结论 具有 PFGE 高度相似性的肺炎克雷伯菌可以通过 MLST 进一步确认或区分。

【关键词】 肺炎克雷伯菌;脉冲场凝胶电泳;多位点序列分型

Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* by pulse-field gel electrophoresis in combination with multilocus sequence typing GAO Yuan¹, ZHANG Li², LI Ma-chao¹, HUANG Cheng², REN Hong-yu¹, ZHOU Hai-jian¹, ZHU Bing-qing¹, LI Qian¹, WANG Xiao-lei², SHAO Zhu-jun¹. 1 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Chengdu Children's Hospital

Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To type *Klebsiella pneumoniae* through methods including pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in combination with multilocus sequence typing. Methods Four selected different EPs, referring to the Standard Operating Procedure of PulseNet China, were used. The single colony of *Klebsiella pneumoniae* was quantified after enriched culture. Embedding organisms in agarose and genome DNA were lysed with Proteinase K and then digested by restriction endonuclease Xba I, to produce agarose gel. Fingerprint was obtained through PFGE and bands were marked with their molecular weights and then analyzed by BioNumerics software. Using MLST to analyze the strains that were highly similar, by PFGE typing Results By comparing the four results from each EPs, fk3 (switch time from 6s to 36s, total run time is 18.5 hours) seemed to be better than the others. 59 strains of *Klebsiella pneumoniae* were divided into 47 PFGE types and 19 PFGE clusters. The highly similar strains could be typed into ST-340、ST-342、ST-343、ST-344、ST-345 by MLST. Among them, ST-342、ST-343、ST-344、ST-345 types were all new MLST types that were reported in China. Conclusion Highly similar *Klebsiella pneumoniae* typed by PFGE could also be typed by MLST.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; Pulse-field gel electrophoresis; Multilocus sequence typing

克雷伯菌属(*Klebsiella*)是重要的条件致病菌和医源性感染菌之一^[1,2]。在疾病的暴发或流行中,脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术结合菌株的流行病学资料、菌株的其他生物特征及毒力基因信息,可分析疾病的传染源、传播途径和基因分型特征等^[3]。多位点序列分型(MLST)是 1998 年发展起来的一种新的基因分析方法^[4],2005 年 Diancourt 等^[5]将该技术应

用于肺炎克雷伯菌的基因分型上。为快速便捷地对院内感染的菌株进行分析,同时建立较为完善的 PFGE 电泳条件,本研究采用 PFGE 技术对某儿童医院分离的肺炎克雷伯菌株进行基因分型研究,并对 PFGE 带型高度相似的菌株进行 MLST 分型。

材料与方 法

1. 菌株来源及鉴定:肺炎克雷伯菌参考株为:CMCC46114、CMCC46105、CMCC46115、CMCC46117 购自中国药品生物制品检定所;CGMCC11526、CGMCC 11734、CGMCC11639、CGMCC11736 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,其中

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.015

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(高源、李马超、任红宇、周海健、朱兵清、李倩、邵祝军);四川省成都市儿童医院(张砾、黄成、王晓蕾)

通信作者:邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

CGMCC11736与CMCC46115为不同菌种中心保管的同一株菌株, H9812为PulsNet实验室提供的标准菌株。

59株试验菌株为某儿童医院2005—2006年临床分离菌株(表1), 所有菌株均经过法国生物梅里埃公司的API细菌鉴定系统鉴定, 菌落形态及生化特性与肺炎克雷伯菌株特征均符合。

2. 主要试剂及仪器设备: 限制性内切酶 *Xba* I、Taq酶、dNTP(大连宝生物公司), Seakem Gold低熔点琼脂糖(美国Cambrex Bio Science Rockland公司), 琼脂糖(上海YiTO Bio-instrument公司)。蛋白酶K(德国Merck公司), 脉冲场凝胶电泳仪CHEF MAPPER System(美国Bio-Rad公司), 凝胶成像系统Gel Doc XR(美国Bio-Rad公司), 细菌基因组DNA提取试剂盒(德国Qiagen公司)PCR基因扩增仪(美国Stratagene公司Robocycler® Gradient 40型)、100 bp DNA Ladder Marker和Goldview替代染料购自北京华美生物工程公司, 引物由北京赛百盛公司合成, PCR产物测序由北京六合华大基因科技股份有限公司完成。

3. PFGE实验: 根据已报道方法适当改进^[3,6-8]。

(1) 胶块制备: 刮取适量培养过夜的细菌, 调整比浊值为5.0, 取400 μl细菌悬浊液于事先高压灭菌的1.5 ml eppendorf管中, 37℃孵育5 min后加入20 μl蛋白酶K(20 mg/ml), 与400 μl溶解完全并后置56℃水浴30 min以上的1% Seakem Gold胶(内含1% SDS)混匀后, 将混合液加入模具, 室温下静置15 min后, 制成胶块。将胶块移入5 ml细胞裂解液中, 54℃水浴摇床(130 r/min)孵育2~4 h, 50℃水浴摇床中使用同温度纯水清洗2次, 每次10 min, 同温度TE buffer清洗4次, 每次15 min, 清洗后胶块置于TE中备用。

(2) 酶切及制胶: 将切取的2 mm宽胶块置于200 μl *Xba* I酶切缓冲液中(此时缓冲液中不加酶), 37℃缓冲15 min, 小心吸取缓冲液后, 重新加入含有限制性内切酶 *Xba* I (60 U)的酶切缓冲液200 μl, 37℃酶切4 h, 吸出酶切缓冲液, 加入200 μl 0.5×TBE, 将胶块加在制胶模具的梳子齿上, 吸除残余液体后干燥3 min, 将梳子置于制胶模具适当位置后, 确保胶块均完全与模具底部接触, 向已调水平的模具中缓慢注入1% Seakem Gold, 室温凝固30 min。

(3) 电泳: 在脉冲场凝胶电泳仪用0.5×TBE缓冲液, 14℃, 6 V/cm, 120°, 适当参数下进行电泳, 分子量标志物为标准菌株H9812。

表1 2005—2006年某儿童医院临床分离菌株相关资料及PFGE分型分群结果

菌株编号	分离时间 (年-月-日)	来源病区	PFGE分群
51638	2005-09-26	新生儿病区	1
60327	2006-02-23	内四病区	1
60546	2006-03-27	内四病区	1
61130	2006-06-15	新生儿病区	1
50139*	2005-01-27	新生儿病区	2
50722	2005-05-01	新生儿病区	2
50751*	2005-05-06	ICU病区	2
51074	2005-06-24	内六病区	2
51103	2005-06-28	ICU病区	2
60013	2006-01-03	新生儿病区	2
60267	2006-02-13	ICU病区	2
60365	2006-02-28	ICU病区	2
50152	2005-01-29	ICU病区	3
62513	2006-11-22	内四病区	3
60386	2006-03-03	新生儿病区	4
60615	2006-04-05	ICU病区	4
60620	2006-04-06	新生儿病区	4
60728	2006-04-14	新生儿病区	5
51090	2005-06-27	新生儿病区	6
60110*	2006-01-19	新生儿病区	6
61716	2006-08-17	新生儿病区	6
61957	2006-09-06	内四病区	6
51665	2005-10-04	新生儿病区	7
60309	2006-02-20	ICU病区	7
60388	2006-03-03	新生儿病区	7
60390	2006-03-04	新生儿病区	7
60516	2006-03-22	新生儿病区	7
60573	2006-03-29	新生儿病区	7
51039	2005-06-18	内五病区	8
51465	2005-08-22	内三病区	8
51601	2005-09-19	新生儿病区	8
60056	2006-01-13	新生儿病区	8
60744	2006-04-25	内四病区	8
51151	2005-07-06	新生儿病区	9
60014	2006-01-03	新生儿病区	9
60345	2006-02-25	ICU病区	9
61183*	2006-06-22	ICU病区	9
61233*	2006-06-27	ICU病区	9
52033	2005-12-11	新生儿病区	10
60188	2006-02-01	新生儿病区	11
60222	2006-02-06	新生儿病区	11
60329	2006-02-23	内四病区	12
50795	2005-05-13	新生儿病区	13
50940	2005-06-02	新生儿病区	13
51061	2005-06-21	新生儿病区	13
51163	2005-07-07	新生儿病区	13
60249	2006-02-10	新生儿病区	13
62692	2006-12-10	内四病区	13
60551	2006-03-27	新生儿病区	14
60946*	2006-05-24	内五病区	14
62919*	2006-12-31	ICU病区	14
60833	2006-05-10	新生儿病区	15
60957*	2006-05-24	外科病区	15
50401	2005-03-16	ICU病区	16
51040	2005-06-19	新生儿病区	17
50748*	2005-05-06	ICU病区	18
50759	2005-05-06	内三病区	18
50774	2005-05-09	ICU病区	18
51908	2005-11-18	新生儿病区	19

注: *来源于尿液; †来源于血液; ‡代表2株菌为同一病例同一次住院的2次检测中检出菌株; §来源于脓液; ¶来源于皮肤分泌物; 其他样品均来源于痰液

(4)图像分析:电泳结束后,将胶块放入1 μg/ml的EB液中染色30 min,清水脱色1 h后,凝胶成像系统 Gel Doc XR 下观察结果。PFGE 图像应用 BioNumerics (Version4.0) 数据库软件 (Applied Maths BVBA, Belgium) 处理,识别图像条带。聚类图类型选择 UPGMA (unweighted pair group method with averages) 方法,条带位置差异容许度 1.0%。

4. MLST 实验:基因组 DNA 的提取和 7 个管家基因位点的片段 PCR 扩增:采用德国 QIAGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明书严格操作,提取的基因组 DNA 于 -20 °C 保存备用。7 个管家基因分别为: *rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB* 及 *tonB*, 参照 <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html> 公布的标准方案进行,引物及退火温度见表 2。管家基因位点的测序和比对:采用扩增引物作为测序引物,对扩增产物经纯化后用进行双向测序并拼接,测序结果通过 Internet 提交至 http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/primers_Kpneumoniae.html 进行比对,得到相应基因分型。

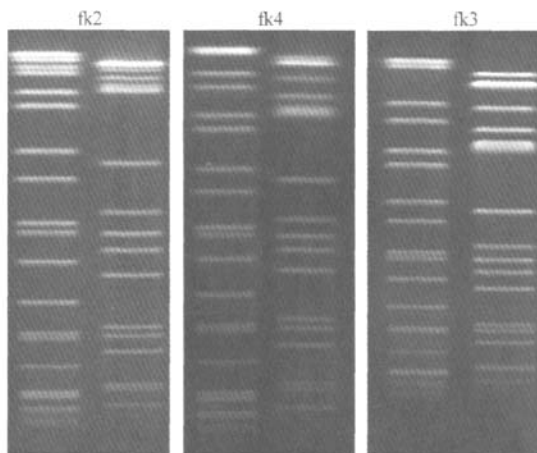
表 2 MLST 扩增引物及退火温度

引物	退火温度(°C)	引物序列(5' - 3')
<i>rpoB</i> -f	50	GGCGAAATGGCWGAGAACCA
<i>rpoB</i> -r	50	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
<i>gapA</i> -f	60	TGAAATATGACTCCACTCACGG
<i>gapA</i> -r	60	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
<i>mdh</i> -f	50	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG
<i>mdh</i> -r	50	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG
<i>pgi</i> -f	50	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC
<i>pgi</i> -r	50	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT
<i>phoE</i> -f	50	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG
<i>phoE</i> -r	50	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
<i>infB</i> -1f	50	CTCGTGCTGGACTATATTCG
<i>infB</i> -1r	50	CGCTTTCAGTCAAGAACTTC
<i>tonB</i> -1f	45	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT
<i>tonB</i> -1r	45	ATTGCGCCGGCTGRGCRGAGAG
<i>infB</i> -2f	50	ACTAAGTTGCCTCCGGCGAAGC
<i>pgi</i> -2f	65	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
<i>pgi</i> -2r	65	TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT

结 果

1. PFGE 电泳参数优化^[9]:电泳体系为 1% SeaKem Gold agarose; *Xba* I 限制性内切酶; 0.5 × TBE; 电压 6.0 V/cm, 脉冲夹角 120° 的标准下; 对 PFGE 电泳参数进行优化比较, 起始脉冲时间 1 ~ 6 s, 终止脉冲时间 20 ~ 40 s, 电泳时间 16 ~ 19 h, 选择了 *fk1*: 起始脉冲时间 1 s, 终止脉冲时间 30 s, 电泳时

间 16 h; *fk2* 起始脉冲时间 6 s, 终止脉冲时间 20 s, 电泳时间 18 h; *fk3*: 起始脉冲时间 6 s, 终止脉冲时间 36 s, 电泳时间 18.5 h; *fk4*: 起始脉冲时间 4 s, 终止脉冲时间 40 s, 电泳时间 19 h 四个条件进行比较, 比较中发现, 四个条件下, *fk2* 条件下小分子量的片段条带分离距离较分散, 大分子量的片段条带分离距离较集中, 因此在小分子量条带分离和识别方面效果较好, *fk4* 条件下大分子量的片段条带分离距离较分散, 小分子量的片段条带分离距离较集中, 因此在大分子量条带分离和识别方面效果较好, 而综合整体分型效果来看, *fk3* 条件下电泳得到的各个片段条带分离距离较均匀, 避免了因大分子量片段条带距离较近或小分子量片段条带距离较近造成识别困难, 而此条件下条带间的相似系数最低, 因此本研究中, 最终采用的肺炎克雷伯菌株 PFGE 分型的优化条件为: 1% SeaKem Gold agarose; *Xba* I 限制性内切酶酶切; 0.5 × TBE; 电压 6.0 V/cm, 脉冲夹角 120°; 起始脉冲时间 6 s, 终止脉冲时间 36 s, 电泳时间 18.5 h, 温度 14 °C (图 1)。



注:从左至右分别为 Marker H9812 及同一菌株在不同 *fk2*、*fk4* 及 *fk3* 条件下电泳结果

图 1 肺炎克雷伯菌株优化条件前后 PFGE 电泳图

2. 肺炎克雷伯菌株 PFGE 分析结果:对经 API 生化鉴定符合肺炎克雷伯菌株生化特征的 59 株临床分离肺炎克雷伯菌株的 PFGE 分型显示, 59 株肺炎克雷伯菌共分为 47 个不同的 PFGE 带型, 以 70% 相似度为标准, 可分为 19 个不同的群 (表 1), 其中 PFGE-2、PFGE-7、PFGE-9、PFGE-13、PFGE-18 群中部分菌株具有高度一致性 (图 2)。

3. 选取 PFGE-2、PFGE-7、PFGE-9、PFGE-13、PFGE-18 群中具有高度一致性菌株进行 MLST 分型分析, 其 MLST 分型结果及详细资料比较见表 3 和表 4。

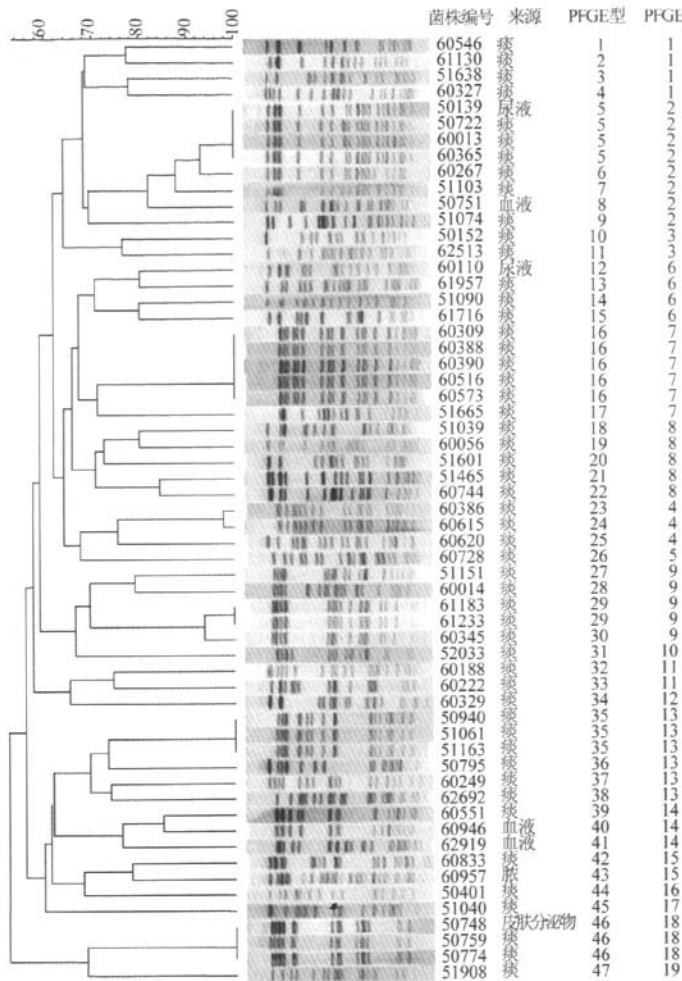


图2 59株肺炎克雷伯菌株PFGE聚类分析

PFGE分析方法通过优化PFGE电泳参数,得到了较好的电泳结果,便于PFGE方法的推广及比较。

MLST通过对菌株DNA中的7个管家基因内的序列分析,组合成不同的基因型,这种方法的优势在于分析的是菌株DNA上基因的核苷酸序列,因此数据可以标准化,从而便于不同实验室之间资料比较,同时,这些序列具有遗传的稳定性与变异的差异性,因此是分子生物学和流行病学研究的较好技术方法。

本研究中的菌株为多个PFGE群,其中PFGE-2、PFGE-7、PFGE-8、PFGE-9、PFGE-13这5个PFGE群所包含的菌株数占总数的50.8%(30/59),可能为该儿童医院肺炎克雷伯菌的主要基因型;其中PFGE-2、PFGE-7、PFGE-9、PFGE-13、PFGE-18群中部分菌株具有高度相似性,而进一步对这些菌株进行MLST分型得到了较为一致的结果,其中PF18群的菌株通过MLST分型与其他高度相似菌株得到进一步的区分(表4),由此可见,PFGE带型较为一致的菌株可通过MLST进行区分。

通过对肺炎克雷伯菌株进行的PFGE及MLST分型研究,发现分离于

表3 某儿童医院临床分离株MLST结果

菌号	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	ST
50940	2	1	5	2	4	4	12	345
51061	2	1	5	2	4	4	12	345
51163	2	1	5	2	4	4	12	345
50774	2	6	2	1	9	27	102	343
50759	2	6	2	1	9	27	102	343
50748	16	24	21	27	47	22	103	344
60365	3	3	1	1	1	1	18	340
50139	3	3	1	1	1	1	18	340
50722	3	3	1	1	1	1	18	340
60013	3	3	1	1	1	1	18	340
60309	2	1	1	1	1	1	100	342
60390	2	1	1	1	1	1	100	342
60516	2	1	1	1	1	1	100	342
60573	2	1	1	1	1	1	100	342

讨 论

肺炎克雷伯菌在革兰阴性细菌造成的院内感染中一直占据着较为重要的地位^[10,11],本研究采用的

表4 某儿童医院临床分离株MLST与PFGE分型结果比较

菌株编号	来源病区	临床诊断	标本来源	标本分离	
				时间 (年-月-日)	PFGE MLST 分型 分型
50139	新生儿病区	肺炎	尿液	2005-01-27	2 340
50722	新生儿病区	新生儿肺炎	痰	2005-05-01	2 340
50748	ICU病区	HIE	皮肤分泌物	2005-05-06	18 344
50759	内三病区	急性支气管炎	痰	2005-05-06	18 343
50774	ICU病区	支肺	痰	2005-05-09	18 343
50940	新生儿病区	-	痰	2005-06-02	13 345
51061	新生儿病区	黄疸	痰	2005-06-21	13 345
51163	新生儿病区	CMV感染	痰	2005-07-07	13 345
60013	新生儿病区	肺炎	痰	2006-01-03	2 340
60309	ICU病区	肺炎	痰	2006-02-20	7 342
60365	ICU病区	肺炎	痰	2006-02-28	2 340
60388	新生儿病区	肺炎	痰	2006-03-04	7 342
60390	新生儿病区	肺炎	痰	2006-03-04	7 342
60516	新生儿病区	肺炎	痰	2006-03-22	7 342
60573	新生儿病区	肺炎	痰	2006-03-29	7 342

2005年5—7月肺炎克雷伯菌株具有较高的聚集性,可能存在PFGE-13群(ST-345型)菌株在院内扩散传播;同样,2006年2—3月分离的部分肺炎克雷伯菌株具有相同基因特征,可能存在着PFGE-7群(ST-342型)菌株的传播;另外PFGE-2群(ST-340型)菌株在2005—2006年均检出,提示可能为该区域内较为主要的流行菌株群别。

PFGE-18群的部分菌株经MLST分型后,分别确定为ST-343型和ST-344型,且从ST-343型和ST-344型的7个位点的比较来看,基本排除了两者属相同克隆群的可能性。

经过MLST分型分析,发现ST-342、ST-343、ST-344、ST-345均为原MLST数据库中新发现基因型。

综上所述,在同一区域不同时间可能存在相同基因型或克隆群的肺炎克雷伯菌株的流行,使用单一PFGE方法对聚集性病例分离菌株进行分型研究可能存在误判,结合MLST方法对PFGE分型相似性较高的菌株进行分析和确认具有较好的应用价值。

参 考 文 献

- [1] Si TB, Peng HM, Yang QP. Distribution and antimicrobial resistance of pathogens isolated from lower respiratory tract in respiratory ward from 2006 to 2007. *Chin J Nosocomiol*, 2009, 19(10):1289-1292. (in Chinese)
司徒冰,彭慧敏,杨秋平. 2006—2007年呼吸病区下呼吸道感染病原菌耐药性监测. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(10): 1289-1292.
- [2] Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 2000, 68(12):6744-6749.
- [3] Pang B, Jing HQ, Zheng H, et al. Molecular typing of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated in China with pulsed field gel electrophoresis. *Chin J Epidemiol*, 2002, 23(2): 123-126. (in Chinese)
逢波,景怀琦,郑翰,等. 我国部分产生志贺毒素肠出血性大肠埃希菌O157:H7脉冲场凝胶电泳分型. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(2):123-126.
- [4] 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.
- [5] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8):4178-4182.
- [6] Xu RL, Xu JB, Bu NH, et al. Detection of ESBLs-producing *K.pneumoniae* nosocomial infection by pulse field gel electrophoresis and epidemiological study. *Chin J Nosocomiol*, 2005, 15(11):1217-1220. (in Chinese)
徐瑞龙,许健波,卜黎红,等. 脉冲场凝胶电泳检测院内产ESBLs肺炎克雷伯菌及流行病学分析. *中华医院感染学杂志*, 2005, 15(11):1217-1220.
- [7] Ye YQ, Ma JY, Zhang WL, et al. Analysing genomic polymorphism of *Klebsiella pneumoniae* by pulsed-field gel electrophoresis. *Chin J Microbiol Immunol*, 2003, 23(4):314-316. (in Chinese)
叶杨芹,马佳敏,张文莉,等. 应用脉冲凝胶电泳技术分析肺炎克雷伯菌染色体多态性. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(4):314-316.
- [8] Gori A, Espinasse F, Deplano A, et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(10):2448-2453.
- [9] Zhang J, Diao B, Zhang N, et al. Comparison of different electrophoretic parameters of pulse-field gel electrophoresis for *Vibrio cholerae* subtyping. *J Microbiol Methods*, 2007, 71(1): 15-22.
- [10] Mena A, Plasencia V, Garcia L, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(8):2831-2837.
- [11] Ko KS, Yeom JS, Lee MY, et al. Clonal dissemination of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) -producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Korean hospital. *J Korean Med Sci*, 2008, 23(1):53-60.

(收稿日期:2010-02-25)

(本文编辑:万玉立)