

## 海南省类鼻疽流行区分离出泰国伯克霍尔德菌

郑霄 陈海 朱雄 蔡虹 黎礼达 李欢 尤鑫 平静 夏连续 李伟

【关键词】 泰国伯克霍尔德菌; 类鼻疽病

**Discovery of *Burkholderia thailandensis* isolates from melioidosis endemic areas of Hainan, China** Zheng Xiao<sup>1</sup>, Chen Hai<sup>2</sup>, Zhu Xiong<sup>2</sup>, Cai Hong<sup>1</sup>, Li Lida<sup>2</sup>, Li Huan<sup>2</sup>, You Xin<sup>3</sup>, Ping Jing<sup>3</sup>, Xia Lianxu<sup>1</sup>, Li Wei<sup>1</sup>. 1 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Sanya People's Hospital; 3 Beijing Center for Disease Control and Prevention

Corresponding authors: Li Wei, Email: liwei@icdc.cn; Xia Lianxu, Email: xialianxu@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10004-215), Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 814389), National Key Scientific Instrument and Equipment Development Projects of China (No. 2012YQ090197) and Hainan Key Scientific and Technological Project (No. ZDXM2014143).

【Key words】 *Burkholderia thailandensis*; Melioidosis

类鼻疽 (melioidosis) 是由类鼻疽伯克霍尔德菌 (*Burkholderia pseudomallei*, 类鼻疽伯克菌) 引起的一种严重热带传染病<sup>[1]</sup>。海南地区类鼻疽流行病学调查发现, 三亚等地人群中类鼻疽血清阳性率高达 13.7%<sup>[2]</sup>; 但当地确诊的类鼻疽病患者相对较少。本研究在海南省南部地区进行环境中类鼻疽伯克菌及与其相似的泰国伯克菌 (*Burkholderia thailandensis*) 调查。

## 1. 材料与方法:

(1) 样品采集与菌株分离培养: 参照“国际类鼻疽工作组”推荐的环境类鼻疽伯克菌采样原则及分离方法<sup>[1]</sup>, 于 2014 年 4 月在海南省南部东方、乐东、三亚、陵水、万宁等县

(市) 的 20 个采样点共采集稻田土、污水等样品 70 份, 送实验室进行菌株分离培养。

(2) 细菌学检测: 疑似菌落转种于血平板及 Ashdown 选择平板, 35 °C 培养 48 ~ 72 h 后观察菌落形态特征; 革兰染色镜检; 使用类鼻疽抗原检测胶体金试剂进行血清学鉴定; 将疑似菌株接种于 API 20NE 生化反应板, 29 °C 孵育 24 h, 48 h 后, 读取结果并记录。

(3) 16S rDNA 序列分析: 参照文献[3], 通过特异 16S rRNA 基因对疑似菌株进行鉴定。PCR 扩增及测序引物: 16S\_27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'); 16S\_1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')。

(4) 多位点序列分型 (MLST): 参照文献[4], 收集菌株培养物并提取染色体 DNA, 然后进行 7 个等位基因的 PCR 扩增及测序。PCR 采用 TaKaRa LA Taq with GC Buffer 系统, 50 μl 反应体系。扩增条件: 95 °C 2 min; 94 °C 40 s, 58 °C 40 s, 72 °C 40 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物双向测序, 测序结果校对后递交类鼻疽伯克菌 MLST 数据库 (<http://bpseudomallei.mlst.net>), 获得等位基因序列号并确定菌株序列型 (ST)。

(5) 毒力因子检测: 利用 PCR 检测分离菌株中三型分泌系统 (type III secretion system, TTSS1)、伯克菌致死因子 (*Burkholderia* Lethal Factor 1, BLF1) 等类鼻疽伯克菌毒力基因的携带情况。TTSS1 引物: BpTT4176F (5'-CGT CTC TAT ACT GTC GAG CAA TCG-3'), BpTT4290R (5'-CGT GCA CAC CGG TCA GTA TC-3'); BLF1 引物: BPSL1549F (5'-CGC TGC TGG AGG GTG TAT GT-3'), BPSL1549R (5'-CCG GCA CCT TGA ATG TCT TTC-3')。PCR 反应体系及扩增条件同上, 以类鼻疽伯克菌 BP003、BP010 为阳性对照。

## 2. 结果:

(1) 菌株分离与细菌学鉴定: 70 份环境样品中共分离出 4 株类鼻疽伯克菌/泰国伯克菌疑似细菌: HN14、HN44、HN61、HN82; 采样地点、来源等见表 1。Ashdown 选择平板上, 分离细菌为粉红或浅紫色扁平菌落, 周边皱褶, 有金属光泽; 血平板上, 为灰白色菌落, 可见 α 溶血, 有金属光泽。革兰染色镜检: 革兰阴性短杆菌。类鼻疽抗原血清学鉴定, 4 株细菌均为阳性。生化鉴定: 4 株菌反应结果的数字图谱为 1157577, 与类鼻疽伯克菌相比, 仅“阿拉伯糖同化反应”结果不同 (表 1)。

(2) 16S rDNA 序列分析: 4 株细菌的 16S rDNA 序列 (约 1 380 bp) 与泰国伯克菌标准株 (E264) 16S rDNA 序列同源性最高, 分别为 100.0%、100.0%、99.9% 和 100.0%; 与类鼻疽伯

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.01.023

基金项目: 国家科技重大专项 (2012ZX10004-215); 海南省自然科学基金 (814389); 国家重大科学仪器设备开发专项 (2012YQ090197); 海南省重点科技计划项目 (ZDXM2014143)

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传染病预防控制国家重点实验室 (郑霄、蔡虹、夏连续、李伟); 三亚市人民医院 (陈海、朱雄、黎礼达、李欢); 北京市疾病预防控制中心 (尤鑫、平静)

郑霄、陈海同为第一作者

通信作者: 李伟, Email: liwei@icdc.cn; 夏连续, Email: xialianxu@icdc.cn

表1 4株泰国伯克菌的表型特征、MLST型别、毒力基因携带情况

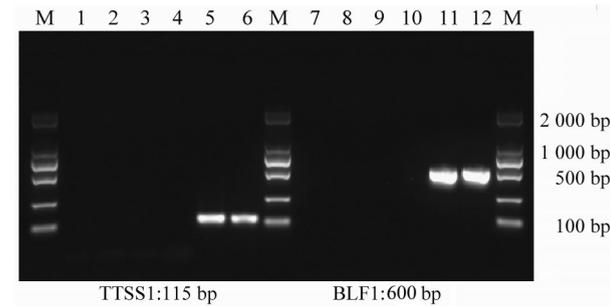
菌株	分离地区	来源	α溶血	阿拉伯糖同化反应	MLST型别	TTSS1	BLF1
HN14	乐东县卡法林场	泥塘污水	+	+	ST76	-	-
HN44	三亚海棠湾镇	稻田泥土	+	+	ST345	-	-
HN61	万宁县铜鼓镇	稻田泥土	+	+	ST345	-	-
HN82	乐东县抱由镇	橡胶园土	+	+	ST345	-	-
BP003*	海南三亚	类鼻疽患者	+	-	ST46	+	+

注：\*类鼻疽伯克菌对照株

克菌(K96243)16S rDNA序列同源率为99.1%、99.1%、99.0%和99.1%，差异碱基数分别为12、12、13和12。

(3)MLST:4株菌分为2种ST型:HN14为ST76型(6, 10, 15, 8, 10, 14, 9),其余3株为ST345型(6, 10, 15, 8, 10, 14, 8)。ST76与ST345相似度高:7个等位基因位点中仅 $ndh$ 不同。2种序列型与泰国类鼻疽伯克菌标准菌株E264(ST80: 6, 10, 16, 8, 10, 14, 8)的遗传相似度较高:分别在2个位点( $gmhD$ ,  $ndh$ )和1个位点( $gmhD$ )存在差异。

(4)毒力基因携带情况:分离菌株均不携带TTSS1及BLF1相关基因,见图1。



注:1~4/7~10分别为HN14、HN44、HN61和HN82;阳性对照:5、11为BP003,6、12为BP010;M:DL2000 Marker

图1 TTSS1、BLF1相关基因的PCR扩增电泳结果

3. 讨论:类鼻疽伯克菌与鼻疽伯克菌是伯克菌属中最重要的2种病原菌,分别引起类鼻疽和鼻疽2种烈性传染病。泰国伯克菌是与其遗传距离最为接近的不致病伯克菌<sup>[4]</sup>,三者统称为类鼻疽伯克菌群(*Burkholderia pseudomallei* complex)。

本研究首次在海南省类鼻疽流行区分离到泰国伯克菌,其流行病学意义:其一,4个泰国伯克菌阳性采样点所在镇中,有2个(三亚海棠湾镇、乐东县抱由镇)近年曾出现类鼻疽病例,提示泰国伯克菌与类鼻疽伯克菌的分布存在重叠性。在类鼻疽流行区,类鼻疽伯克菌与泰国伯克菌共存可能是一种普遍现象。其二,根据形态特征、抗原血清学鉴定、生

化反应等传统方法鉴定泰国伯克菌的特异性较差、结果不稳定,提示泰国伯克菌与类鼻疽伯克菌难于区分,在病原学调查过程中要注意鉴别,防止误判。与此相比,16S rDNA序列分析、MLST、毒力基因特异PCR等基于DNA序列的鉴定方法更加有效。其三,使用类鼻疽伯克菌特异抗原检测试剂进行血清学鉴定时,4株泰国伯克菌均为阳性,证实二者存在抗原交叉反应。以往研究中报道海南省南部地区人群抗类鼻疽伯克菌血清阳性率较高可能受此影响。

Ma等<sup>[5]</sup>曾经在广西壮族自治区类鼻疽流行区的土壤中分离到类鼻疽伯克菌。本研究采用相似方法进行检测,未在海南省流行地区分离到该菌。究其原因,可能与调查期间处于旱季,降雨稀少,环境中类鼻疽伯克菌密度较低、每个采样地点采集样品数相对较少等因素有关。尚不能排除采样地区环境中存在类鼻疽伯克菌的可能性。

参 考 文 献

[1] Limmathurotsakul D, Dance DA, Wuthiekanun V, et al. Systematic review and consensus guidelines for environmental sampling of *Burkholderia pseudomallei* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(3): e2105.  
 [2] Yang S. Melioidosis research in China [J]. Acta Trop, 2000, 77(2): 157-165.  
 [3] Brett PJ, DeShazer D, Woods DE. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species [J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48(Pt 1): 317-320.  
 [4] Godoy D, Randle G, Simpson AJ, et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 2068-2079.  
 [5] Ma G, Zheng D, Cai Q, et al. Prevalence of *Burkholderia pseudomallei* in Guangxi, China [J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(1): 37-39.

(收稿日期:2014-08-15)

(本文编辑:万玉立)