

我国部分地区克罗诺杆菌分离株分种及其方法的比较研究

杜小莉 李伟 阚颀 崔志刚 崔晶花

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

通信作者: 崔晶花, Email: cuijinghua@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.02.022

【摘要】 目的 比较研究克罗诺杆菌分离株的分种方法, 探讨其中准确、快速有效分种方法。方法 采用生化实验和对基因 16S rRNA, *fusA* 序列聚类分析的方法。结果 105 株菌的 4 项生化结果呈现 6 种情况, 但无法将 *C. turicensis* 和 *C. universalis* 两个种分开; 基于 16S rRNA 基因分析分种结果将 105 株菌分为 5 组, 无法将 *C. sakazakii* 和 *C. malonaticus* 这两个种的菌株有效地分开; 而基于 *fusA* 基因分析分种结果可将所有菌株分为 *C. sakazakii* (58 株)、*C. malonaticus* (30 株)、*C. dublinensis* (11 株)、*C. turicensis* (5 株)、*C. muytjensii* (1 株)。结论 目前采用 *fusA* 序列分种相对简捷有效, 但缺乏直观, 需再研究达到快速检测目的的其他方法。

【关键词】 克罗诺杆菌; 序列分析; 分种

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004215; 2013ZX10004-101)

Study on identification of *Cronobacter* spp. species in 11 areas in China Du Xiaoli, Li Wei, Kan Biao, Cui Zhigang, Cui Jinghua

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
Corresponding author: Cui Jinghua, Email: cuijinghua@icdc.cn

【Abstract】 Objective To compare different methods on the identification of *Cronobacter* (*C.*) spp. species and to choose an optimum one. **Methods** Biochemical test, 16S rRNA and *fusA* sequencing methods were carried out. **Results** When using the biochemical test, 105 strains showed six different conditions but *C. turicensis* and *C. universalis* could not be effectively identified. Under the 16S rRNA sequencing analysis, all the strains were divided into 5 groups but *C. sakazakii* and *C. malonaticus* were tangled. Finally, all the strains were identified into 58 *C. sakazakii*, 30 *C. malonaticus*, 11 *C. dublinensis*, 5 *C. turicensis*, 1 *C. muytjensii*, under the *fusA* sequencing analysis. **Conclusion** Currently, *fusA* sequencing analysis seemed an effective method for identifying the species of *Cronobacter*. Since *fusA* sequencing analysis method was less intuitive, another method for rapid testing should be developed.

【Key words】 *Cronobacter* spp.; Sequencing analysis; Species

Fund program: National Science and Technology Major Project of China (2012ZX10004215; 2013ZX10004-101)

克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)通过污染婴幼儿配方奶粉或代乳品引起婴幼儿脑膜炎、败血症、坏死性小肠结肠炎等^[1-3]。虽然克罗诺杆菌感染的病例报道并不多,但由于致死率较高,并关系到婴幼儿食品风险问题,近些年受到越来越多关注^[4-7]。目前克罗诺杆菌属 [*Cronobacter* (*C.*) spp.] 可分为 7 个种,分别为 *C. sakazakii*、*C. malonaticus*、*C. dublinensis*、*C. turicensis*、*C. muytjensii*、*C. universalis* 和 *C. condimenti*^[8-9],

不同“种”之间的生物学特性有较大的区别,流行病学分布情况不同,致病性也可能存在一定差异^[10],因此分“种”是克罗诺杆菌研究的基础,对进一步认识了解克罗诺杆菌具有重要意义。国外有报道应用生化反应,或者对 16S rRNA、*recN*、*rpoB*、*fusA* 等基因序列分析进行分种研究^[11-13],但对我国分离株采用哪种方法能更快速有效地分种还未见相关报道。为此本研究用不同方法对 11 个省份分离的 105 株克罗诺

杆菌进行分种,并对各种方法进行比较研究。

材料与方法

1. 菌株来源:105株菌主要分离自11个省份(北京、广西、河北、湖北、湖南、辽宁、四川、山东、上海、山西、天津)的食品(67株)、农村饮用水(33株)和健康人肛拭子标本(5株)。其中食品又包括婴幼儿米粉(31株)、婴幼儿配方奶粉(23株)、面条(11株)、饼干(1株)和蔬菜(1株)。标准菌株 ATCC51329 和 ATCC29544 由中国检验检疫科学院提供。所有菌株通过目标基因为 *dnaG* 的荧光定量 PCR 鉴定^[14]。结果为阳性菌株在 TSA 琼脂平板上培养,并储存在 -80 °C 的冰箱内。

2. 主要试剂和仪器:包括 API 20E 生化试剂(法国生物梅里埃公司)、基因组 DNA 提取试剂盒(QIA amp®公司)、Real-Time Premix Ex Taq™(中国大连 TaKaRa 公司)、离心机(德国 Enppendorf 公司)、labcycler standard PCR 仪(德国 Senso 公司)、7500Fast 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)、ABI3730 基因序列分析仪(美国 ABI 公司)。

3. 实验方法:

(1)生化试验:除对所有菌株进行生化反应试验外,还附加了传统的单管生化试验,包括吡啶(Ind)卫矛醇(Dul)、 α -甲基-D-吡喃葡萄糖苷(AMG)的产酸,以及丙二酸盐(Malo)合成试验。主要在基础培养基(蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 1 g/L, 氯化钠 5 g/L, 酚红指示剂 0.018 g/L)上添加 5% Dul、AMG。

(2)核酸提取:将培养在 TSA 琼脂平板上的单克隆菌接种于 5 ml 的胰蛋白胨培养液中过夜培养。取 1 ml 培养液 8 000 r/min 离心 5 min 后用 QIA amp® 核酸提取试剂盒提取,方法参照说明书。

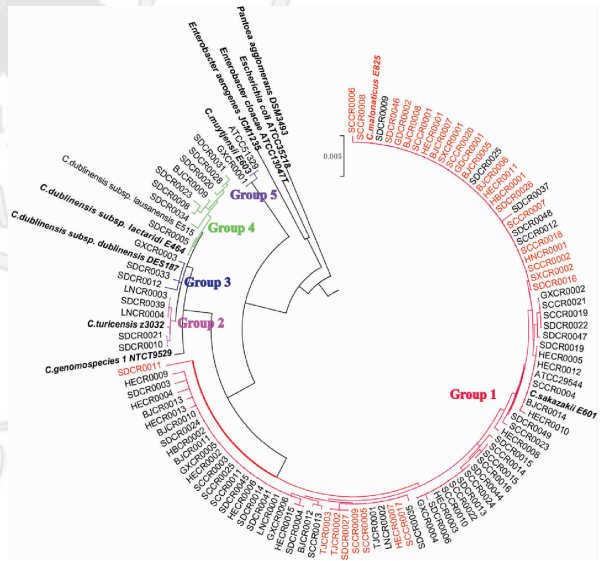
(3)16S rRNA 和 *fusA* 基因测序:扩增 16S rRNA 基因所使用的引物为 616V (5'-AGAGTTT GATYMTGGCTC-3') 和 630R (5'-CAKAAAGGA GGTGATC-3'), PCR 反应条件:95 °C 2 min; 94 °C 15 s, 52 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 94 °C 15 s, 52 °C 30 s, 72 °C 129 s, 15 个循环; 72 °C 7 min。根据 Joseph 等^[9]的研究结果, *fusA* 基因可用于克罗诺杆菌分种研究,所使用的扩增引物为 *fusA*-F (5'-GAAACCGTATGGCGTCAG-3') 和 *fusA*-R (5'-AGAACCGAAGTGCAGACG-3'), PCR 反应条件:96 °C 1 min; 96 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 反应中的聚合酶为 TaKaRa 公司生产的 PreMix。PCR 产物纯化

后,用 BigDye 试剂配制测序反应体系,在 ABI 3730XL 测序仪上进行测序。16S rRNA 基因使用的测序引物为 16F (5'-AGAGTTT GATYMTGGCTC-3'), 16WR1 (5'-CAKAAAGGAGGTGATCC-3')。 *fusA* 基因测序引物为 *seqfusA*-F (5'-GCTGGATGC GGTAATTGA-3'), *seqfusA*-R (5'-CCCATACCAG CGATGATG-3')。

4. 数据分析:序列聚类分析采用极大似然比算法(maximum-likelihood algorithm),并利用 Mega 5.0 软件实现。统计评估时,引导值(bootstrap)使用迭代次数为 1 000。参考菌株序列下载于 NCBI 网站。

结果

1. 生化分种:用 API 20E 生化试剂条鉴定所有菌株,结果只能到克罗诺杆菌“属”水平,且鉴定率为 51.1% ~ 99.9%。根据 Iversen 等^[8]2007 年对各个种生化特点的分析,增加了 Ind、Dul、AMG 产酸,以及 Malo 合成试验,结果 105 株菌 4 个生化结果呈现 6 种情况(图 1)。



注: Group1 是 *C. sakazakii* (黑色) 和 *C. malonaticus* (红色的) 集合; Group2 为 *C. turicensis*; Group3 和 Group4 的菌株均属于 *C. dublinensis*; Group5 为 *C. muytjensii*

图1 105株克罗诺杆菌16S rRNA基因序列聚类分析的分种结果

2. 16S rRNA 分种: 将 16S rRNA 的测序结果拼接,再加上 NCBI 公布的各种参考菌株序列,通过 Mega 5.0 软件进行极大似然比算法聚类,可将 105 株菌分为 5 组(图 1), Group1 是 *C. sakazakii* 和 *C. malonaticus* 两个种的集合,红色标识是通过生化反应鉴定为 *C. malonaticus* 的菌株,黑色标识的是通过生化反应鉴定为 *C. sakazakii* 的菌株,聚类结果显

示无法将两个种分开。Group2中的4株菌与 *C. turicensis* 参考菌株聚在一起, Group3和Group4中的菌株均属于 *C. dublinensis*, Group5仅有1株菌与 *C. mytjensii* 聚类在一起。所有菌株的相似度 >98%。

3. 基因 *fusA* 分种: 将基因 *fusA* 的测序结果拼接整理后, 与数据库 (<http://www.pubmlst/cronobacter>) 中的序列比对, 获得等位基因编码。本研究中有6株菌的 *fusA* 基因序列为新序列, 获得的新编码为63~68。序列通过 Mega 5.0 软件进行极大似然比算法, 结果显示所有菌株可分为5个组(图2)。再根据 Joseph 等^[13] 的结论将105株菌分种为 *C. sakazakii* (58株), *C. malonaticus* (30株), *C. dublinensis* (11株), *C. turicensis* (5株), *C. mytjensii* (1株)(图1和表1)。

讨论

克罗诺杆菌通过生化反应分为16种生物型, 由于随着菌株数目的增加, 生物型别种类不断增加且复杂化, 因此 Iversen 等^[8, 15] 通过分子生物学的方法对菌株进行重新分类, 将原来的“种”升为“属”的水平, 并对“属”内的菌株分种。目前商业化的生化检测试剂或生化仪器只能将克罗诺杆菌鉴定到“属”的水平, 因此本研究首先考虑是否可以通过增加生化项目的方法对克罗诺杆菌属进行进一步分种。根据 Iversen 等^[15] 2007年的研究结果, 研究中增加了 Ind、Dul、AMG、Malo 生化反应试验。虽然大致可将菌株分开, 但由于 *C. turicensis* 和 *C. genomospecies 1* (*C. universalis*) 结果一致, 无法将该两个“种”分开, 故又对菌株进行 16S rRNA 测序分析, 但亦无法将 *C. sakazakii* 和 *C. malonaticus* 两个“种”有效分开。因此将两方法结合才能对克罗诺杆菌进行分种。

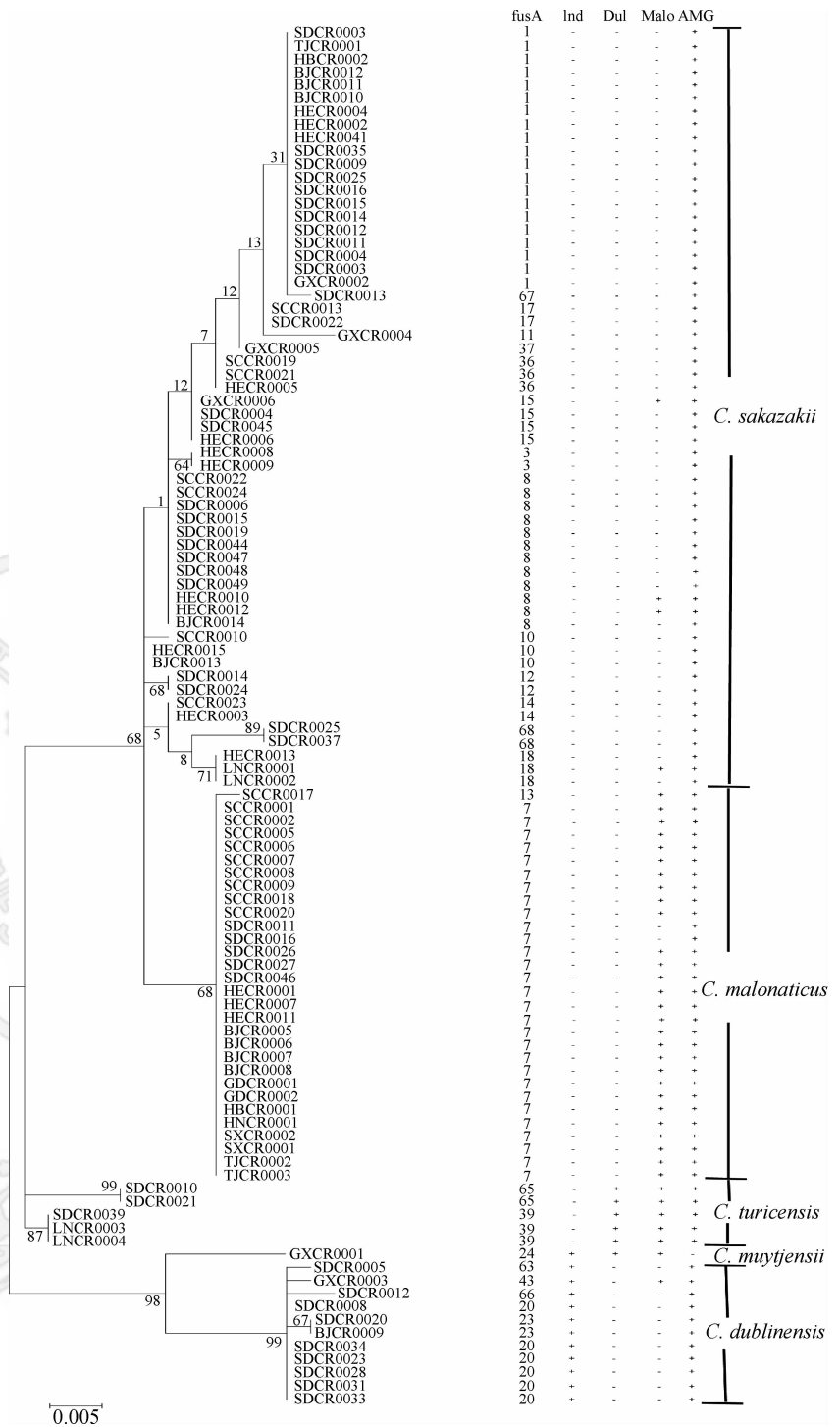


图2 105株克罗诺杆菌 *fusA* 基因序列聚类分析的分种结果

表1 105株克罗诺杆菌分离株的生化试验结果

菌种	株数	Ind	Dul	Malo	AMG
<i>C. sakazakii</i>	54	-	-	-	+
	4	-	-	+	+
<i>C. malonaticus</i>	28	-	-	+	+
	2	-	-	-	+
<i>C. dublinensis</i>	10	+	-	-	+
	1	+	-	+	+
<i>C. turicensis</i>	5	-	+	+	+
<i>C. mytjensii</i>	1	+	+	+	-

有报道认为可通过个别基因,例如 *recN*、*rpoB*、*fusA* 等进行序列分析将菌株分种。虽然近些年 *recN* 和 *ropB* 两种基因较多用于细菌种属鉴定,但由于 Joseph 等^[13]是基于 7 个等位基因的多位点序列分型 (MLST) 分析基础上建立的 *fusA* 基因分种方法,所以后者较前两种基因更具有科学性。本研究对所有菌株 *fusA* 基因序列聚类分析后的分种结果为 58 株 *C. sakazakii*, 30 株 *C. malonaticus*, 11 株 *C. dublinensis*, 5 株 *C. turicensis*, 1 株 *C. muytjensii*。这与通过生化和 16S rRNA 序列分析两种方法结合的分种结果稍有不同,主要是在 *C. sakazakii* 和 *C. malonaticus* 两个种上有差异。Malo 阳性菌株属于 *C. malonaticus*, 阴性菌株属于 *C. sakazakii*, 而 *fusA* 基因序列聚类分种将 2 株 Malo 阳性菌株划分到 *C. sakazakii*, 2 株 Malo 阴性菌株划分到 *C. malonaticus* 中。针对该矛盾结果,2013 年 Joseph 等^[16]又比较了生化反应分种方法和序列聚类分析方法,发现生化反应方法存在一定缺陷,不适用于克罗诺杆菌分种。由于 Iversen 等在对克罗诺杆菌属进行分种时,也主要运用了 f-AFLP、16S rRNA 测序、DNA 杂交等分子生物学方法,并由于生化反应具有不稳定性的特点,因此在本研究中最最终以基因 *fusA* 序列聚类分析结果作为分种的依据。

综上所述,本研究通过生化反应、16S rRNA 和 *fusA* 序列分析对克罗诺杆菌属进行分种方法的比较,表明目前采用 *fusA* 序列分析进行分种相对简捷有效,即如果获得的 *fusA* 等位基因编码是已知的,那么可以直接判断菌株“种”的类别。但该方法仍缺乏直观性,需将在序列分析的基础上研究其他方法,以达到快速检测目的,便于推广应用。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Arseni A, Malamou-Ladas E, Koutsia C, et al. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii* [J]. J Hosp Infect, 1987, 9(2): 143–150. DOI: 10.1016/0195-6701(87)90052-1.
- [2] Biering G, Karlsson S, Clark NC, et al. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(9): 2054–2056.
- [3] Gallagher PG, Ball WS. Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii* [J]. Pediatr Radiol, 1991, 21(2): 135–136. DOI: 10.1007/BF02015629.
- [4] Caubilla-Barron J, Hurrell E, Townsend S, et al. Genotypic and phenotypic analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from an outbreak resulting in fatalities in a neonatal intensive care unit in France [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(12): 3979–3985. DOI: 10.1128/JCM.01075-07.
- [5] Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature [J]. Medicine, 2001, 80(2): 113–122.

- [6] Gosney MA, Martin MV, Wright AE, et al. *Enterobacter sakazakii* in the mouths of stroke patients and its association with aspiration pneumonia [J]. Eur J Intern Med, 2006, 17(3): 185–188. DOI: 10.1016/j.ejim.2005.11.010.
- [7] See KC, Than HA, Tang T. *Enterobacter sakazakii* bacteraemia with multiple splenic abscesses in a 75-year-old woman: a case report [J]. Age Ageing, 2007, 36(5): 595–596. DOI: 10.1093/ageing/afm092.
- [8] Iversen C, Mullane N, McCardell B, et al. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. dublinensis subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. lausannensis subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. lactaridi subsp. nov [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(6): 1442–1447. DOI: 10.1099/ijms.0.65577-0.
- [9] Joseph S, Cetinkaya E, Drahovska H, et al. *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolated from spiced meat, and *Cronobacter universalis* sp. nov., a species designation for *Cronobacter* spp. genomospecies 1, recovered from a leg infection, water and food ingredients [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2012, 62(6): 1277–1283. DOI: 10.1099/ijms.0.032292-0.
- [10] Grim CJ, Kothary MH, Gopinath G, et al. Identification and characterization of *Cronobacter iron* acquisition systems [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(17): 6035–6050. DOI: 10.1128/AEM.01457-12.
- [11] Kuhnert P, Korczak BM, Stephan R, et al. Phylogeny and prediction of genetic similarity of *Cronobacter* and related taxa by multilocus sequence analysis (MLSA) [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 136(2): 152–158. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.022.
- [12] Stoop B, Lehner A, Iversen C, et al. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the genus *Cronobacter* [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 136(2): 165–168. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.023.
- [13] Joseph S, Sonbol H, Hariri S, et al. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence typing [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(9): 3031–3039. DOI: 10.1128/JCM.00905-12.
- [14] Seo KH, Brackett RE. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay [J]. J Food Prot, 2005, 68(1): 59–63.
- [15] Iversen C, Lehner A, Mullane N, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1 [J]. BMC Evol Biol, 2007, 7: 64. DOI: 10.1186/1471-2148-7-64.
- [16] Joseph S, Hariri S, Forsythe SJ. Lack of continuity between *Cronobacter* biotypes and species as determined using multilocus sequence typing [J]. Mol Cell Probes, 2013, 27(3–4): 137–139. DOI: 10.1016/j.mcp.2013.02.002.

(收稿日期: 2015-07-02)

(本文编辑: 张林东)