

· 实验室研究 ·

脉冲场凝胶电泳技术对成都市两起细菌性痢疾暴发的分型研究

苗艳芳 黄薇 黄剑屏 李振军 金东 崔志刚 赵爱兰 梁娜 白艳

【摘要】 目的 运用脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)和聚合酶链反应(PCR)技术对成都市两起细菌性痢疾暴发分离株进行分析。**方法** 利用 PCR 检测志贺菌分离株 *ipaH* 基因和 *ial* 基因。用 PFGE 对菌株进行分型,所得结果用 BioNumerics V 4.0 软件 UPGMA 方法进行聚类分析。**结果** 所试 54 株分离菌 *ipaH* 基因均为阳性,48 株为 *ial* 阳性。以 *Xba* I 酶切后 PFGE 分型,崇州可分为 4 个带型,有 26 株型别一致,占实验菌株(36 株)的 72%,为优势菌株。自凉拌白肉中分离的菌株带型与优势菌株相同。大邑县可分为 8 个带型,有 10 株型别一致,占实验菌株(18 株)的 56%。崇州和大邑县的优势菌株带型差异较大。**结论** 利用 PFGE 能够有效地鉴别细菌性痢疾的暴发和传播来源。

【关键词】 痢疾; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

Molecular typing of isolates from two dysentery outbreaks in Chengdu, through pulsed field gel electrophoresis technology MIAO Yan-fang*, HUANG Wei, HUANG Jian-ping, LI Zhen-jun, JIN Dong, CUI Zhi-gang, ZHAO Ai-lan, LIANG Na, BAI Yan. *Chengdu Municipal Center for Disease Control and Prevention, Chengdu 610000, China

Corresponding author: HUANG Wei, Email: maomaochong007@sohu.com

【Abstract】 Objective Using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and polymerase chain reaction (PCR) typing to analyze strains isolated from two outbreaks caused by *Shigella sonnei* and to trace the source of infection. **Methods** Virulence genes *ipaH* and *ial* were detected by PCR and PFGE was used to subtype the isolates. Patterns were compared, using the software BioNumerics. **Results** Within the 54 isolates, all were *ipaH* positive with 48 as *ial* positive. Strains from the Chongzhou outbreak were clustered into 4 PFGE patterns, with the predominant pattern accounted for 72% of the analyzed strains. The pattern of strains isolated from the cold pork with sauce was identical to the predominant pattern. The strains from Dayi outbreak were clustered into 8 PFGE patterns and the predominant pattern accounted for 56% of the test strains. **Conclusion** Strains from the two outbreaks were quite different and the 'cold pork with sauce' seemed to be the major source of infection, causing the outbreak of diarrhea in Chongzhou. The sources of infection of the Dayi outbreak might be complicated whereas PFGE showed a discriminatory and reproducible laboratory tool in the epidemiologic investigation on outbreaks of diarrhea.

【Key words】 Diarrhea; Pulsed field gel electrophoresis; Identification

由于志贺菌致病性强以及传染来源的多样性,使得实验室分析暴发存在着一定的困难^[1-3],传统志贺菌分型技术主要基于细菌的表型,如血清分型,噬菌体分型等,但都有一定局限。基于基因水平的脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)具有重复性好、特异性高、分辨能力强等特点,被广泛应用于细菌的分子分型研究。本研究对 2006 年 9 月成都市崇州和大邑县两所学校发生由志贺菌引起的感染性腹泻暴发从

患者以及食品中分离到宋内菌株,进行分子流行病学研究并对可能的传染来源进行分析。

材料与与方法

1. 实验用菌株:54 株受试菌为 2006 年成都市两个地区(其中崇州县 36 株,大邑县 18 株)痢疾暴发疫情中分离得到的志贺菌株(表 1)。所有菌株经成都市疾病预防控制中心(CDC)微生物检验科鉴定为宋内痢疾杆菌。用于分子量标准的国际标准菌株——沙门菌 H9812 由全国病原细菌实验室监测网络 PulseNet China(中国 CDC 传染病预防控制所)提供。

作者单位:610000 成都市疾病预防控制中心(苗艳芳、黄薇、黄剑屏、梁娜、白艳);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(李振军、金东、崔志刚、赵爱兰)

通讯作者:黄薇,Email:maomaochong007@sohu.com

表1 54 株菌株的来源、毒力基因检测以及 PFGE 带型

菌株编号	分离地区	标本来源	<i>ipaH</i>	<i>ial</i>	PFGE 带型	菌株编号	分离地区	标本来源	<i>ipaH</i>	<i>ial</i>	PFGE 带型
SHI06SC22	崇州	病例	+	+	1	SHI06SC58	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC24	崇州	病例	+	-	1	SHI06SC59	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC33	崇州	病例	+	-	1	SHI06SC60	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC04	崇州	病例	+	+	1	SHI06SC62	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC05	崇州	病例	+	-	1	SHI06SC63	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC06	崇州	病例	+	+	1	SHI06SC64	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC61	崇州	病例	+	-	1	SHI06SC71	崇州	病例	+	+	2
SHI06SC72	崇州	病例	+	+	1	SHI06SC34	崇州	病例	+	+	4
SHI06SC23	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC27	崇州	病例	+	-	3
SHI06SC25	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC43	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC26	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC44	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC28	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC46	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC29	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC47	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC30	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC52	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC31	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC10	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC32	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC11	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC35	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC07	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC36	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC08	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC37	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC09	大邑	病例	+	+	11
SHI06SC38	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC50	大邑	病例	+	+	12
SHI06SC39	崇州	凉拌白肉	+	+	2	SHI06SC45	大邑	病例	+	+	5
SHI06SC01	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC53	大邑	病例	+	+	6
SHI06SC02	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC48	大邑	病例	+	+	8
SHI06SC03	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC54	大邑	病例	+	-	8
SHI06SC55	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC42	大邑	病例	+	+	7
SHI06SC56	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC51	大邑	病例	+	+	9
SHI06SC57	崇州	病例	+	+	2	SHI06SC49	大邑	病例	+	+	10

2. 主要试剂和耗材:稀有位点限制性内切酶 *Xba* I (宝生物大连有限公司产品),琼脂糖 SeaKem Gold Agarose (Cambraex Bio Science Rockland 公司产品),蛋白酶 K (Merck 公司产品),SDS (北京鼎国生物技术发展中心进口分装),EDTA、Tris 和硼酸 (上海生工生物工程技术有限公司产品);十二烷基肌氨酸钠 (SIGMA 公司产品);其他相关试剂购自北京化工厂,试剂均为分析纯。细菌浓度测定用试管为 REF352054 (美国 BD 公司);50 ml Screw-cap 试管为 Corning Centrifuge Tube (美国 Corning 公司)。

3. 主要仪器:PFGE 仪为 Bio-Rad CHEF Mapper XA System 和凝胶成像仪为 Bio-Rad Gel Doc 2000 系统均为美国 Bio-Rad 公司产品;水浴摇床为 Grant OLS2000 (英国 Grant 公司产品);浊度仪为 Densimat (法国 BioMerieux Vitek 公司产品);PCR 扩增仪使用 PTC200 (MJ 公司产品)。

4. 实验方法:

(1) PCR 实验:挑取过夜培养的单个菌落于 100 μl 纯水中,水煮 10 min, 12 000 r/min 5 min, 取上清作为模板。① *ipaH* (侵袭质粒抗原 H 基因) 基因检测:引物序列: P1: 5'-TGG AAA AAC TCA

GTG CCT CT-3', P2: 5'-CCA GTC CGT AAA TTC ATT CT-3'。20 μl 扩增体系, 扩增条件: 预变性 94℃ 5 min, 后续循环 94℃ 45 s, 55℃ 60 s, 72℃ 60 s, 25 个循环;末轮循环 72℃ 5 min; 扩增产物 423 bp。② *ial* (侵袭相关位点基因) 基因检测:引物序列 P1: 5'-CTG GAT GGT ATG GTG AGG-3', P2: 5'-GGA GGC CAA CAA TTA TTT CC-3'。20 μl 扩增体系, 扩增条件: 预变性 94℃ 5 min, 后续循环 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s, 25 个循环;末轮循环 72℃ 5 min; 扩增产物 320 bp。

(2) PFGE 实验:具体实验步骤参照美国 CDC 的 PulseNet 实验手册。实验使用 *Xba* I 酶切, 酶用量为 45 U/胶块, 200 μl 酶切体系, 37℃ 酶切 2 h。电泳条件为 2000~2200 ml 0.5× TBE, 电压 6.0 V/cm, 脉冲夹角 120°, 起始脉冲时间 2.16 s, 终止脉冲时间 54.17 s, 电泳时间 18 h。

(3) 电泳图像分析和结果聚类分析:PFGE 图像应用 BioNumerics (V 4.0) 数据库软件 (Applied Maths BVBA, Belgium) 进行分析。

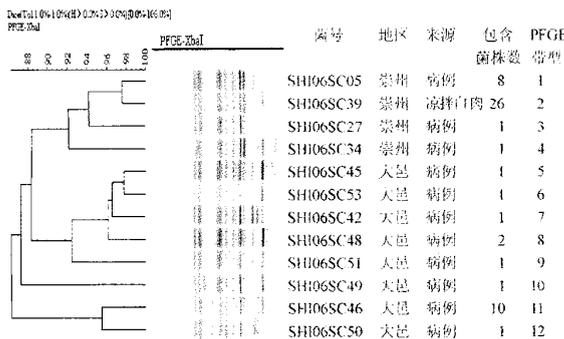
结 果

1. 流行病学背景:2006 年 9 月 1-8 日,成都市

崇州县某学校发生一起细菌性痢疾暴发,该校共 1274 名师生,共发现实验室确诊病例 339 例,临床诊断病例 17 例,总罹患率为 27.94%。患者均为食堂就餐学生,流行呈单峰型,发病高峰期集中在第 3 天,约占病例总数的 65.17%。9 月 1 日的午餐为共同进餐史,从就餐留取的凉拌白肉样本中检出宋内痢疾杆菌。2006 年 9 月 6-14 日,成都市大邑县某学校也发生一起细菌性痢疾暴发,该校共有教职工 1052 人,共发现实验室确诊病例 72 例,临床诊断病例 34 例,总罹患率 10.08%,发病高峰期集中在第 3 天,约占病例总数的 38.67%,但未从环境中分离到宋内痢疾杆菌。

2. PCR 分析:对收集的崇州(36 株)和大邑(18 株)县菌株进行 *ipaH* 和 *ial* 基因的 PCR 检测。侵袭质粒抗原 H,由 *ipaH* 基因编码,在质粒和染色体上存在多个拷贝,通常被认为是志贺菌属的鉴定基因,实验中 54 株分离株 *ipaH* 基因阳性率为 100%,再次从基因水平证实分离菌均为志贺菌;侵袭相关位点(*ial* 基因)位于侵袭性大质粒上,对细菌的增殖和侵袭起调节作用,通过对该基因的检测可以了解菌株侵袭性大质粒的存在情况。除 6 株(崇州 5 株,大邑县 1 株) *ial* 为阴性外,其余 48 株均为 *ial* 阳性,阳性率为 88.9%,说明大质粒在此次暴发中起到的作用(表 1)。

3. 序列分析;利用 BioNumerics 对 PFGE 图像进行了聚类分析,相似度系数采用 Dice,聚类方法为 UPGMA (Unweighted Pair group Method using Arithmetic averages),位置差异容许度设置为 1.0%,将其中 54 株菌分成 12 个带型(图 1)。



注:其中“包含菌株数”表示 *Xba* I PFGE 电泳结果条带完全相同的菌株数量

图1 崇州、大邑县两起菌痢暴发分离菌株的 PFGE 聚类分析

从分型结果看,两次食物中毒分离的菌株都有各自的主要型别。崇州县以 2 型为主,此带型菌株占崇州实验菌株总数的 72%。大邑县以 11 型为主,占大邑实验菌株总数的 56%,且这两种主要带型之间聚类相似性差异较大;虽然两起暴发在很相近的时间(相差 5 d 时间发病),但两个地区的暴发属于独立事件。崇州和大邑地区分离菌株均有多个型别(可能是由多种型别的宋内志贺菌引起)。其中从崇州县可疑凉拌白肉中分离的菌株型别也为 2 型,可能为崇州暴发的感染来源。

讨 论

近年来,基于核酸水平的分子生物学方法在病原体分析中的应用,可以从分子水平研究爆发性流行中致病微生物之间的相关性^[4-8]。病原菌基于基因水平的分子分型又称作细菌的“指纹图谱”分析,可以判断时间相近的不同暴发事件是来自同一传染源还是各自独立的事件^[6]。PFGE 能对全菌的 DNA 分析,因其重复性、实验室间可比性以及分辨力强而被誉为细菌分子生物学分型技术的“金标准”,通过 PFGE 分型可以鉴定比较菌株是否一致,对于细菌性传染病的监测、追踪、传播途径调查和识别等有着非常重要的意义^[9-11]。

虽然血清分析方法操作简单,但不能将所有志贺菌进行分型,Reeve 等^[1,12]用商品化的血清进行分型时发现 23% 的志贺菌不能分型。本研究的 54 株菌株均用血清鉴定到宋内菌,而用 PFGE 方法可以明确的区分出 12 种不同的带型,进一步证明 PFGE 有更好的区分能力,可以反映更多的差异信息量,有应用价值。

Phantouamath 等^[13]的志贺菌多重 PCR 结果显示,标本中 *ipaH* PCR 结果阳性并不一定发病,可能是志贺菌的携带者,而 *ipaH* 和 *ial* 双基因阳性为细菌性痢疾现症患者。本实验中 *ipaH* 基因均为阳性,48 株为 *ial* 阳性。这就说明有 48 例为菌痢的现症患者,其余 *ial* 阴性的 6 例可能为志贺菌的携带者。其中 6 株 *ial* 阴性的菌株 PFGE 带型主要分布在 1 型(4 株),另外 3 型和 8 型各 1 株;究竟侵袭性大质粒与其 PFGE 带型间有何联系还有待进一步研究。

通过分析分离株 PFGE 带型的相似性,其中崇州县 36 株分离菌中有 26 株的型别一致,为此次暴发的优势菌株。自凉拌白肉样本分离的菌株 PFGE

带型与优势菌株带型相同,都为 2 型。提示凉拌白肉可能是引起此次崇州县细菌性痢疾暴发的感染来源。从凉拌白肉的制作过程显示,猪肉煮熟切片后,加入调料并直接加入芹菜和生葱调制,而葱和芹菜是成堆清洗,存在清洗不净加之制作过程未经高温处理,有污染痢疾杆菌的可能,由于当日当地气温较高,且食堂操作间和存放间气温较其他房间高,因而易造成痢疾杆菌在凉拌白肉中快速繁殖。

从大邑县检出菌株的分型结果看,18 株菌中有 10 株的型别一致,为此次暴发的优势菌株。但该地分离菌株的型别较多(18 株共有 8 个型别),分析原因可能是污染来源复杂,也可能是菌株变异引起的;在一起暴发中的分离菌株,基因变异常常在 PFGE 图谱中表现为相似度高,仅有个别条带的差异^[14]。综合分析认为水污染导致该疫情的可能性比较大,该校自备水井无井台,地势低,距厕所近;生活饮用水检测细菌总数和大肠埃希菌严重超标,而且学生有饮用生水的习惯,虽然没有从水源中检测到志贺菌,这可能与取样的时间和方法有关。

综上所述,成都市这两起疫情,食源性和水源性污染应是预防控制的重点,尤其学校是人群密集单位,疫情往往呈聚集性、爆发性。因此学校应是预防感染性腹泻的重点地区。

参 考 文 献

- [1] Reeve G, Martin DL, Pappas J, et al. An outbreak of shigellosis associated with the consumption of raw oysters. *N Engl J Med*, 1989, 321(4): 224-227.
- [2] Davis H, Taylor JP, Perdue JN, et al. A shigellosis outbreak traced to commercially distributed shredded lettuce. *Am J Epidemiol*, 1988, 128(6): 1312-1321.
- [3] Lee LA, Ostroff SM, McGee HB, et al. An outbreak of shigellosis at an outdoor music festival. *Am J Epidemiol*, 1991, 133(6): 608-615.

- [4] 俞顺章,陈声林.我国分子流行病学研究进展.中华流行病学杂志,2000,21(5):383-386.
- [5] Tondo EC, Guimaraes MCM, Henriques JAP, et al. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. *Can J Microbiol*, 2000, 46(12): 1108-1114.
- [6] 段广才,祁国明.分子流行病学研究及其应用.中华流行病学杂志,1993,14(2):118-121.
- [7] Garg P, Aydianian A, Smith D. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(7): 810-814.
- [8] Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, et al. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9): 4111-4120.
- [9] Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3): 382-389.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infections among children associated with farm visits- Pennsylvania and Washington, 2000. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2001, 50(15): 293-297.
- [11] Gouveia S, Proctor ME, Lee MS, et al. Genomic comparisons and Shiga toxin production among *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a day care center outbreak and sporadic cases in southeastern Wisconsin. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(3): 727-733.
- [12] Liu P Y F, Lau Y J, Hu B S, et al. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *Clin Microbiology*, 1995, 33(7): 1779-1783.
- [13] Phantouamath B, Sithivong N, Insiengmay S, et al. Pathogenicity of shigella in healthy carriers: a study in Vientiane. *Jpn J Infect Dis*, 2005, 58(4): 232-234.
- [14] 刘红露,张京云,冯泽惠,等.脉冲场凝胶电泳分型技术在追溯 O139 霍乱传染来源中的应用.中华流行病学杂志,2006, 27(2): 102-106.

(收稿日期:2007-05-22)

(本文编辑:尹廉)