

四川省嗜肺军团菌基因分型研究*

李红霞¹, 姚 卫¹, 廖虹瑜², 罗隆泽², 曾林子^{2△}

(1. 四川省成都市第一人民医院检验科 610041; 2. 四川省疾病预防控制中心, 成都 610041)

摘要:目的 探讨四川省嗜肺军团菌基因特征。方法 采用基因序列分型(SBT)对四川省 1989—2016 年分离的嗜肺军团菌共 79 株进行了基因型的研究。根据文献报道的军团菌 7 个管家基因, 对 79 株嗜肺军团菌进行 PCR 扩增, SBT 结果测序后上传至欧洲军团菌感染组(EWGLI)数据库得到 ST 分型。结果 79 株嗜肺军团菌分为 33 个 ST 型, 其中有 11 个为新 ST 型(ST2355~ST2365)。33 个 ST 型分为 5 个克隆群(CCs)和 5 个 singleton。结论 SBT 方法能对嗜肺军团菌进行基因分型研究。四川省嗜肺军团菌具备较高的遗传多样性和地区特异性, 有感染人的风险, 应加强对公共卫生环境中军团菌的监测工作。

关键词:嗜肺军团菌; 基因序列分型; 分子检测

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.23.012 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)23-3458-03

Research for gene typing of Legionella pneumophila in Sichuan province*

LI Hongxia¹, YAO Wei¹, LIAO Hongyu¹, LUO Longze², ZENG Linzi^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu First People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Sichuan Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the genetic characteristics of *L. pneumophila* in Sichuan province. **Methods** The sequence-based typing (SBT) were used to describe the genetic polymorphism of 79 strains which were isolated from 1989—2016 in Sichuan province. According to the reference, PCR was used to detect the 7 housekeeping genes, the results were sequenced and compared with the database of EWGLI. **Results** A total 33 sequence types (STs) were obtained with 5 main clonal complex(CCs) and 5 singleton, including 11 novel STs (ST2355—ST2365). **Conclusion** SBT could be applied to study the gene typing of *L. pneumophila* and *L. pneumophila* in Sichuan show the high genetic polymorphism and the regional specificity. The results also suggest that the isolates are a potential threat to the public health, effective control and prevention strategies are urgently needed.

Key words: *L. pneumophila*; gene typing; molecular detection

军团菌是一种兼性胞内寄生菌, 它的生长和繁殖与环境密切相关, 普遍存在于各种水环境和土壤环境中, 在空调冷凝水、冷热水循环系统及温泉水中较为常见。它能以气溶胶的方式通过呼吸道传播, 人体吸入污染有军团菌的气溶胶, 饮用、接触污染的水源或者土壤, 可能引起以肺部感染为主要症状的军团菌病。目前已知军团菌有 52 个种, 70 多个血清型^[1], 90% 以上的军团菌病都是由嗜肺军团菌引起的, 其中嗜肺军团菌血清 1 型菌株(Lp1)为主要的致病血清型^[2]。临床上对军团菌进行分型的传统方法主要采用血清学检测, 但是由于血清交叉反应的存在, 导致分型准确性较低。目前, 用于军团菌分型的手段主要是分子生物学方法, 常见的有基因序列分型(SBT)、多位点可变数目串联重复序列多态性分析(MLVA)、脉冲场凝胶电泳分型(PFGE)、扩增片断长度多态性分型(AFLP)等^[3], 为了解四川省嗜肺军团菌菌株的序列分型特征, 分析菌株间的遗传相关性, 本研究采用了 SBT 法对四川省 1989—2016 年收集到的共 79 株嗜肺军团菌进行分子分型研究。现将结果报道如下。

1 材料与方

1.1 一般材料 选取四川省 1989—2016 年分离到的 79 株嗜肺军团菌, 64 株来源于以下 7 个城市的空调冷却塔水、酒店淋浴水及喷泉的常规监测标本, 其中成都市 47 株、泸州市 5 株、内江市 4 株、南充市 4 株、绵阳市 1 株、雅安市 1 株、自贡市 1

株、乐山市 1 株; 13 株来源于 2014 年对四川省 2 个城市的温泉水调查项目, 其中雅安市 10 株、康定市 3 株; 患者痰液标本分离到 2 株。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养与鉴定 将复苏后的菌株接种于炭粉酵母浸出物培养基中(BCYE, 北京路桥生物试剂有限公司), 在浓度为 5% 的 CO₂ 孵箱中, 37 °C 培养 48~60 h, 根据文献^[4], 用 PCR 方法扩增军团菌属特异性 16S rRNA。用血清凝集方法对嗜肺军团菌进行血清学鉴定(天津生物芯片公司)。

1.2.2 DNA 模板制备 分离纯化嗜肺军团菌后, 与 1.0 mL 生理盐水混合制备成菌悬液, DNA 模板提取按照天根生化科技(北京)有限公司 DNA 提取试剂盒说明书进行操作, 提取的 DNA 置于 -20 °C 保存备用。

1.2.3 SBT 分型研究 根据欧洲军团菌感染工作组(EWG-LI)报道^[5-6], 对嗜肺军团菌 7 个管家基因 *flaA*、*proA*、*momps*、*asd*、*mip*、*pilE* 和 *neuA*(*neuA*^{*}) 分别进行 PCR 核酸扩增和测序。测序后的序列信息与数据库中的序列进行比对分析, 得到 ST 型。PCR 反应均采为 25 μL 反应体系, 其中 1×PCR Mixture(擎科生物有限公司)为 22 μL, 上下游引物(10 mmol)各 1 μL, DNA 模板 1 μL。循环参数: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 35 个循环, 72 °C 终末延伸 10 min。

* 基金项目: 四川省医学会青年创新课题(Q15081)。

作者简介: 李红霞, 女, 主任技师, 主要从事病原生物学方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: forest0832@126.com。

1.3 统计学处理 运用 BioNumerics Version 7.0 软件对所得到的嗜肺军团菌 ST 型别进行聚类分析。采用 SPSS21.0 对数据进行整理,计数资料采用百分数表示。

2 结果

2.1 16S rRNA 及血清学鉴定 对 79 株保存菌进行军团菌属 16S rRNA 检测,毛细管电泳显示,79 株菌均在 650 bp 处有

明显的电泳条带,结果均为阳性。血清凝集实验鉴定出 11 种血清型。主要血清型为 1 型(LP1),共 43 株(54.43%);12 株 LP7(15.19%),6 株 LP6(7.59%),4 株 LP11(5.06%),3 株 LP12(3.80%);LP3、LP9、LP13 和 LP15 分别有 2 株菌(2.53%),1 株 LP5(1.27%),还有 1 株出现交叉凝集现象(LP9 和 LP14),见表 1。

表 1 79 株嗜肺军团菌血清分布[n(%)]

血清型	空调冷却水	淋浴水	喷泉水	温泉水	患者痰液	合计
LP1	30(37.97)	2(2.53)	4(5.06)	6(7.59)	1(1.27)	43(54.43)
LP3	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(2.53)	0(0.00)	2(2.53)
LP5	0(0.00)	1(1.27)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.27)
LP6	4(5.06)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.27)	1(1.27)	6(7.59)
LP7	10(12.66)	0(0.00)	2(2.53)	1(1.27)	0(0.00)	12(15.19)
LP9	2(2.53)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(2.53)
LP10	1(1.27)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.27)
LP11	0(0.00)	0(0.00)	3(3.80)	1(1.27)	0(0.00)	4(5.06)
LP12	1(1.27)	2(2.53)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	3(3.80)
LP13	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(2.53)	0(0.00)	2(2.53)
LP15	1(1.27)	0(0.00)	1(1.27)	0(0.00)	0(0.00)	2(2.54)
LP9/LP14	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.27)	0(0.00)	1(1.27)
合计	49(62.03)	5(6.33)	10(12.66)	14(17.72)	2(2.53)	79(100.00)

2.2 SBT 聚类分型结果 对 79 株嗜肺军团菌进行 7 个管家基因扩增,结果全部为阳性,被分为 33 个 ST 型,有 11 个 ST 型(ST2355~ST2365)为新 ST 型,其余的 22 个 ST 型在 EWGLI 数据库中有报道。10 个 ST 型(ST1、ST36、ST630、ST2359、ST1777、ST187、ST2363、ST328、ST641、ST7)包含 2 株以上的菌株,其余的 23 个 ST 型均只有 1 株。在所有的 ST 型里,以 ST1 型最多,所占比例为 37.9%;其次由高到低依次为 ST630、ST2359、ST1777,所占比例分别 8.8%、5.0%、3.8%。两株来源于患者痰液的菌株分别为 ST36 和 ST1999。

2.3 ST 型间的相互关系分析 为更加详细了解 ST 型间的相互关系,运用 BioNumerics Version 7.0 软件,绘制了四川省嗜肺军团菌的克隆群分布情况图。33 个 ST 型分为 5 个克隆群(CCS)和 5 个 singleton。CC1 群包括 11 个 ST 型,其中 4 个 ST 型分离自温泉(ST690、ST2358、ST2359、ST2360),4 个 ST 型分离自空调冷却水(ST2355、ST1640、ST1562、ST971),2 个 ST 型分离自淋浴水(ST1639 和 ST2357)。CC2 群包括 7 个 ST 型,7 个 ST 型来源于空调冷却水(ST1011、ST7、ST630、ST1604、ST1113、ST1777、ST1),还有 ST1 型来源于喷泉水和淋浴水。CC3 群包括 5 个 ST 型,3 个 ST 型来源于空调冷却水(ST579、ST187、ST242),1 个来源于温泉水(ST2361),1 个来源于喷泉水和患者(ST36)。CC4 群包括 3 个 ST 型,2 个型分离自空调冷却水(ST583 和 ST1279),1 个来源于温泉水(ST641)。CC5 群包含 2 个 ST 型(ST2363 和 ST2364),均来源于喷泉水。5 个 singleton 分属不同的 ST 型,来源也不同。

3 讨论

SBT 法是 EWGLI 用于对嗜肺军团菌进行分子分型的方法,该方法重复性好,实验操作简单,实验结果清晰、可靠,并能与我国其他地区及其他国家作比较,可以作为分子分型的首选方法。此方法选用 flaA、proA、momps、asd、mip、pilE 和 neuA(neuA*) 7 个管家基因进行 PCR 扩增,实验中发现某些菌株无法扩增出 neuA 基因,根据文献[5-6],采用 neuA* 基因扩增,均扩增出阳性结果。本研究有 7 株菌选用了 neuA*,这些

菌株来均分离于人造水环境,包括空调冷却水、淋浴水及喷泉水。本研究第一次应用 SBT 方法建立了四川省嗜肺军团菌分子分型数据库,79 株嗜肺军团菌被分成为 33 个 ST 型,充分说明四川省嗜肺军团菌具有较高的遗传多样性。

目前,EWGLI 数据库已经收录了 11 963 株军团菌,其中 7 972 株(66.64%)军团菌从临床患者分离,3 895 株(32.56%)军团菌从环境标本分离,还有 96 株(0.80%)军团菌来源不明。数据库里一共包括 2 480 种 ST 型。ST1 型是世界上报道最多的型别^[7-11],也是四川省的优势型,占总数量的 37.9%(30/79)。ST1 型菌株在世界范围内普遍存在,分布于环境标本和临床标本中。遗憾的是本研究分离到的 ST1 型菌株均来自于人工水环境,包括空调冷凝水、酒店洗澡水和喷泉水,未自患者身上分离到 ST1。本研究中 2 株来源于患者痰液的菌株分别为 ST36 和 ST1999。

ST630 是四川省嗜肺军团菌分子型别分布中占第 2 位的型别(8.8%),全部来源于空调冷凝水,在四川省的 5 个城市中分离得到:成都、内江、雅安、南充、乐山。ST2355~ST2365 是四川省新发现的型别,分布在空调冷却水、喷泉水、淋浴热水、温泉水里,血清型别也各异,对于这些型别的菌株可进行进一步的研究。剩余的型别在世界范围内都有报道,分离于环境标本中或者临床标本中。因此,应该加强对公共卫生环境的监测工作,避免引起军团病的暴发。

本研究通过运用 SBT 方法,对四川省 1989—2016 年期间分离到的嗜肺军团菌进行分子分型,展示了四川省嗜肺军团菌基因型和菌群的分布特点,预示了四川省嗜肺军团菌可能感染人类的特点,卫生相关部门应加强对公共卫生场所的监督监测工作,并将 SBT 方法运用于嗜肺军团菌分子流行病学监测、追踪军团菌病的传染源及分析暴发流行的趋势。

参考文献

[1] 朱庆义,胡朝晖,赵利伟,等. 环境水军团菌分离培养及其表型与分子分型研究[J]. 中国预防医学杂志,2012,11

(13):805-810.

- [2] Keller BW, Hajjeh R, Maria AD, et al. Community outbreak of Legionnaires disease: an investigation confirming the potential for cooling tower to transmit Legionella species[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(2):257-261.
- [3] 曾林子, 廖虹瑜, 祁腾, 等. 四川省嗜肺军团菌血清 I 型 (LP1) 基因分型研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(9):784-788.
- [4] Lebeau I, Lammertyn E, De Buck E, et al. First proteomic analysis of Legionella pneumophila based on its developing genome sequence[J]. Res Microbiol, 2005, 156(1):119-129.
- [5] Gaia V, Fryn K, Afshar B, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5):2047-2052.
- [6] Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, et al. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing Legionella pneumophila serogroup 1 strains[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6):1965-1968.
- [7] Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, et al. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-

based types among Legionella pneumophila serogroup 1 isolates derived from cooling Tower water, bathwater, and soil in Japan[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(12):4263-4270.

- [8] Lee HK, Shim JI, Kim HE, et al. Distribution of legionella species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of L. pneumophila serogroup 1 in South Korea[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(19):6547-6554.
- [9] Borchardt J, Helbig JH, Luck PC. Occurrence and distribution of sequence types among Legionella pneumophila strains isolated from patients in Germany: common features and differences to other regions of the world[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008, 27(1):29-36.
- [10] Vekens E, Soetens O, De Mendonca R, et al. Sequence-based typing of Legionella pneumophila serogroup 1 clinical isolates from Belgium between 2000 and 2010[J]. Euro Surveill, 2012, 17(43):1-6.
- [11] Zhang L, Li Y, Wang X, et al. High prevalence and genetic polymorphisms of legionella in natural and Man-Made aquatic environments in Wenzhou, China[J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(3):12606-12617.

(收稿日期:2017-07-11 修回日期:2017-09-25)

(上接第 3457 页)

菌,结果显示,ICU 患者的细菌耐药率普遍高于非 ICU 患者,对亚胺培南和美罗培南耐药情况较严重。进一步研究发现,耐碳青霉烯类肠杆菌来自于 ICU 病房患者居多,可能是由于 ICU 病房患者住院时间较长,免疫力低下,危重患者滞留导尿管、进行气管切开、呼吸机的应用等侵袭性操作较多,并频繁使用免疫抑制剂和各类广谱抗菌药物等使细菌耐药性增加,导致耐药率不断上升^[9-10]。

综上所述,定期进行耐药性监测有助于了解医院细菌耐药性变迁,有助于临床医生能够根据细菌培养和敏感试验结果合理使用抗菌药物。

参考文献

- [1] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; M100-S26[S]. Wayne, PA:CLSI, 2016.
- [2] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(5):401-410.
- [3] 张小江,杨启文,孙宏莉,等. 2014 年北京协和医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3):315-322.
- [4] 徐安,卓超,苏丹虹,等. 2005-2014 年 CHINET 克雷伯菌属耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3):267-274.
- [5] 沈继录,潘亚萍,徐元宏,等. 2005-2014 年 CHINET 大

肠埃希菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(2):129-140.

- [6] Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae [J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(7):1499-1504.
- [7] Curello J, MacDougall C. Beyond susceptible and resistant, part II: treatment of infections due to gram-negative organisms producing extended-spectrum β -lactamases[J]. J Pediatr Pharmacol Ther, 2014, 19(3):156-164.
- [8] Rumbo C, Gato E, Lopez M, et al. Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11):5247-5257.
- [9] Morgan DJ, Rogawski E, Thom KA, et al. Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination[J]. Crit Care Med, 2012, 40(4):1045-1051.
- [10] Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, et al. Deaths attributable to carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(7):1170-1175.

(收稿日期:2017-06-29 修回日期:2017-09-11)