

2007 年上海市部分嗜肺军团菌血清 1 型菌株 PFGE 分型研究

陈敏, 陈明亮, 王刚毅, 盛跃颖, 陈洪友, 席曼芳, 姜华, 张雯霞, 吴凡, 张曦*

摘要: [目的] 研究 2007 年上海市公共场所部分空调冷却塔水中分离出来的嗜肺军团菌 1 型(Lp1)的基因特征。[方法] 从空调冷却塔水中检测到 26 株 Lp1 嗜肺军团菌后, 使用脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术对酶切后的 Lp1 军团菌全染色体 DNA 进行电泳获得指纹图谱, 并用 BioNumerics 软件对其进行聚类分析。[结果] 26 株 Lp1 军团菌可分为 15 个 PFGE 型。菌株间相似性系数在 30.00%~100.00% 之间不等, 大部分菌株的 PFGE 型别差异明显, 无优势型别。大部分 PFGE 型别的菌株来源场所单一; 而大部分同一场所来源的军团菌菌株为相同的 PFGE 型。[结论] 2007 年上海市公共场所部分空调冷却塔水中分离出来的 Lp1 军团菌呈现基因多样性。

关键词: 嗜肺军团菌 1 型; 脉冲场凝胶电泳; 指纹图谱; PFGE 型

Genotyping Study on Some Strains of *Legionella Pneumophila* Serotype 1 in Shanghai by Pulsed-field Gel Electrophoresis CHEN Min, CHEN Ming-liang, WANG Gang-yi, SHENG Yue-ying, CHEN Hong-you, XI Man-fang, JIANG Hua, ZHANG Wen-xia, WU Fan, ZHANG Xi*(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China). *Address correspondence to ZHANG Xi; E-mail: xzhang@scdc.sh.cn

Abstract: [Objective] To study the genotypic characteristics of some *Legionella pneumophila* serotype 1 (Lp1) isolated from cooling tower water in public settings of Shanghai in 2007. [Methods] Twenty-six environmental isolates, which were isolated from the cooling tower water, were identified as Lp1. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was applied to draw the fingerprintings of the isolates, while the cluster analysis was employed by BioNumerics software. [Results] Fifteen distinguishable PFGE patterns were differentiated among 26 Lp1 strains. Most of the strains differed in genetic similarity, from 30.00% to 100.00%, with no predominant PFGE pattern. The majority of PFGE patterns were composed of the isolates from the same place, while most of the strains from same source were identified as same PFGE pattern. [Conclusion] Great genotypic diversity was found in Lp1 isolated from cooling tower water in public settings of Shanghai in 2007.

Key Words: *legionella pneumophila* serotype 1; pulsed-field gel electrophoresis; fingerprinting; PFGE pattern

军团菌病是由军团菌引起的急性细菌性肺炎, 在全世界范围内, 超过 90% 的军团菌病由嗜肺军团菌引起, 其中嗜肺军团菌 1 型(Lp1)所占比例达 92%^[1]。军团菌广泛存在于空调冷却塔水系统中, 这可能与军团菌病的暴发有所联系^[2-3]。脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)常被应用于该类暴发中临床分离株和环境分离株的基因分型^[4-5]。

基因多态性和克隆可持续性为分子流行病学提供追溯散发病例或疾病暴发源头的理论依据, 而 PFGE 为分子流行病学提供了技术手段^[4]。PFGE 是将经酶切后的全染色体 DNA 采用脉冲场电泳技术, 通过比较大片段的迁移率来获得指纹图谱, 并采用软件 BioNumerics 对指纹图谱进行聚类分析, 以此进行基因分型^[6]。近年来, 国际上采用 PFGE 的方法对医院

给水系统和公共场所空调冷却塔水系统中分离出的军团菌进行基因分型的研究较多^[4, 7], 而国内在这方面的研究相对滞后。

本研究拟采用脉冲场凝胶电泳对 2007 年上海市公共场所部分空调冷却塔水中分离出来的 Lp1 军团菌进行基因分型, 希望通过该工作获取更为详尽的军团菌资料, 并在分子水平对环境军团菌进行监测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 26 株军团菌均为 2007 年 5~6 月份在上海市公共场所中央空调冷却塔水和冷凝水污染状况调查中分离获得的, 并经生化鉴定、血清学凝集试验和胶乳凝集试验鉴定为 Lp1 型。菌株来源于 6 个不同的场所和 2 种水体(见表 1); 实验菌株地区分布为静安区 13 株, 长宁区 5 株, 卢湾区 4 株, 黄浦区 2 株, 浦东新区 2 株; 作为 PFGE 实验分子量标准对照的布伦敦卢普沙门菌(*Salmonella Braenderup*)H9812 菌株, 由上海市疾病预防控制中心菌种保藏室提供。

[基金项目] 上海市卫生局课题(编号: 2007179); “十一五”科技重大专项(编号: 2008ZX10004-002)

[作者简介] 陈敏(1969-), 男, 学士, 副主任技师; 研究方向: 病原微生物检验; E-mail: mchen@scdc.sh.cn

[*通信作者] 张曦主任医师; E-mail: xzhang@scdc.sh.cn

[作者单位] 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336

表 1 实验菌株来源场所及水体分布
Table 1 The sources and distributions of the tester strains

来源场所 Sources	株数 Number	冷却塔水 Cooling water	冷凝水 Condensed water
医院 (Hospital)	2	2	0
酒店 (Hotel)	12	7	5
宾馆 (Inn)	4	3	1
大厦 (Building)	2	2	0
商场 (Market)	1	1	0
地铁 (Subway)	5	2	3
合计 (Total)	26	17	9

1.1.2 主要试剂 军团菌诊断血清购自日本生研会社, 胶乳凝集试剂盒购自英国 OXOID 公司, 均在有效期内使用; 含 L-半胱氨酸 BCYE 平板和 GVPC 平板购自法国 BioMérieux 公司; Xba I 和 Asc I 限制性内切酶购自英国 New England Biolabs 公司; 蛋白酶 K 购自瑞士 Roche 公司; SeaKem Gold Agarose 购自美国 Cambraex Bio Rockland 公司。

1.1.3 主要仪器 脉冲场凝胶电泳仪 (Bio-Rad CHEF Mapper), 凝胶成像仪 (Bio-Rad GEL Doc2000), 菌液比浊仪 (Siemens Healthcare Diagnostics Dade Microscan Turbidity Meter), 水浴摇床 (Precision), CO₂ 水套式培养箱 (Formar Scientific) 等。

1.2 方法

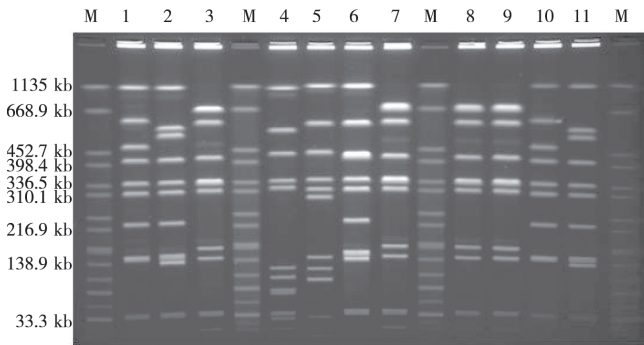
1.2.1 脉冲场凝胶电泳 该方法由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所呼吸道传染病室提供^[8]。含 L-半胱氨酸的 BCYE 平板上划线接种军团菌菌株, 在 CO₂ 培养箱 37℃ 培养 2 d。用棉签刮取适量细菌, 均匀悬浊于细菌悬浮液 CSB (cell suspension buffer) 中, 使用菌液比浊仪测量悬浊液浓度, 调节细菌悬浊液浓度使其数值为 0.45。取 400 μL 细菌悬浊液于 1.5 mL 离心管中, 加入 20 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL), 再与 400 μL 的 1% SeaKem Gold Agarose : 1% SDS (sodium dodecyl sulphate) 混合均匀, 将混合物注入模具。胶块凝固后, 放入 5 mL 含有 25 μL 蛋白酶 K (20 mg/mL) 的细胞裂解液 CLB (cell lysis buffer) 中, 54℃ 摇床中孵育 2 h, 转速 160 r/min。然后用 50℃ 15 mL 灭菌蒸馏水洗胶块 2 次; 再用 50℃ 15 mL TE 洗胶块 4 次, 每次 15 min。用刀片切下约 2 mm 宽的胶块放入 1.5 mL 离心管中, 用 50 U 的 Asc I 于 37℃ 酶切 3 h。将酶切后的胶块贴于梳齿包埋于 1% SeaKem Gold Agarose, 待胶凝固后, 将胶小心放入含 2500 mL 0.5 × TBE (Tris-Borate-EDTA) 缓冲液电泳槽中, 电泳 19 h, 电泳起始转换时间 6.8 s, 最后转换时间 54.2 s, 电压 6 V/cm, 电场夹角 120°, 初始电流控制在 135 mA 左右, 温度 14℃ 电泳结束后用 EB (ethidium bromide) 染色, 去离子水脱色后在凝胶成像仪上照相。

1.2.2 聚类分析 采用 BioNumerics 软件对实验菌株全染色体 DNA 酶切图谱进行聚类分析。

2 结果

2.1 军团菌菌株 PFGE 电泳

将 26 株 Lp1 型军团菌菌株及 PFGE 实验分子量标准对照沙门菌 (*S. Braenderup*) H9812 菌株 (Marker), 制备全染色体 DNA, 军团菌采用限制性内切酶 Asc I 消化, Marker 用限制性内切酶 Xba I 消化后, 进行脉冲场凝胶电泳, 部分电泳结果见图 1。



[注] M: Marker (H9812); 1~11: 部分实验菌株, 实验编号分别为 0018、0019、0020、0021、0022、0023、0024、0025、0026、0010 和 0011。
[Note] M: Marker (H9812). 1~11: part of the strains for experiment, with the number as 0018, 0019, 0020, 0021, 0022, 0023, 0024, 0025, 0026, 0010 and 0011.

图 1 部分实验菌株 PFGE 分型图谱

Figure 1 The fingerprintings of part of tester strains by PFGE

2.2 军团菌菌株 PFGE 电泳图谱的聚类分析

26 株 Lp1 型军团菌菌株全染色体 DNA 酶切图谱经 BioNumerics 软件进行聚类分析, 共分为 15 种 PFGE 型, 分别命名为 LPAs.SH0001~LPAs.SH0015, 具体见图 2。大部分的 PFGE 型别是由同一场所来源的军团菌菌株组成; 但其中 LPAs.SH0004、LPAs.SH0008、LPAs.SH0011 和 LPAs.SH0014 由不同来源的菌株组成, 如 LPAs.SH0011 由来自静安区的酒店 II 的 0002 号、卢湾区的商场 I 的 0003 号、长宁区的宾馆 I 的 0010 号与浦东新区的医院 I 的 0018 号菌株组成。大部分同一场所来源的军团菌菌株属于相同的 PFGE 型, 但来源于静安区的酒店 II 的 0002、0008、0020、0021 号菌株分属于 4 个 PFGE 型 (LPAs.SH0011、LPAs.SH0005、LPAs.SH0014 和 LPAs.SH0002)。

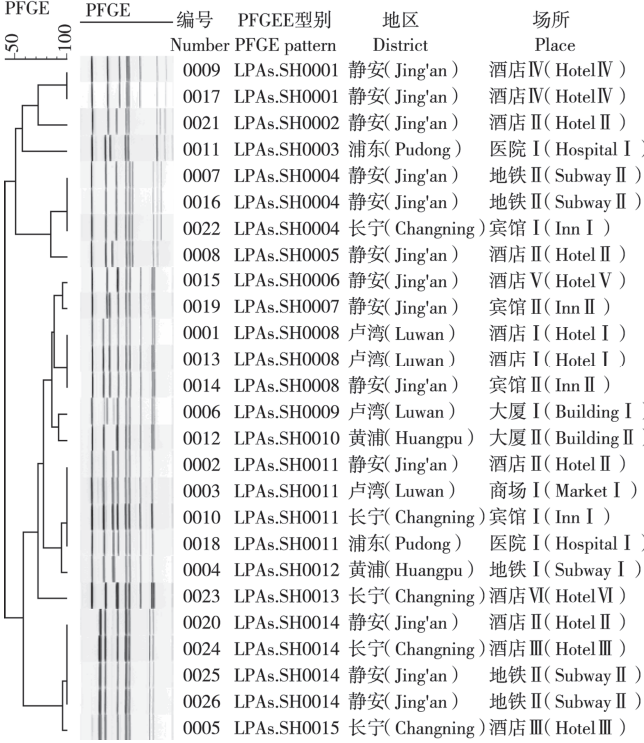


图 2 26 株 Lp1 型军团菌 PFGE 结果聚类图

Figure 2 The PFGE cluster results of 26 of Lp1 strains

2.3 军团菌所在地区菌株间相似性系数

公共场所中央空调冷却塔水中分离出的 26 株 Lp1 型军团菌, 分别来自静安区、长宁区、卢湾区、黄浦区 and 浦东新区, 菌株全染色体 DNA 酶切图谱经聚类分析后, 各地区菌株间相似性系数在 30.00%~100.00% 之间不等, 具体见表 2。

表 2 各地区 Lp1 型军团菌菌株编号及相似性系数

地区 District	菌株编号 Serial number of the strains	各地区菌株间相似性系数(%) Genetic similarity between different strains
静安区 Jing'an district	0002、0007、0008、0009、0014、 0015、0016、0017、0019、0020、 0021、0025、0026	42.21 ~ 100.00
长宁区 Changning district	0005、0010、0022、0023、0024	49.05 ~ 76.19
卢湾区 Luan district	0001、0003、0006、0013	79.43 ~ 100.00
黄浦区 Huangpu district	0004、0012	80.00
浦东新区 Pudong new area	0011、0018	30.00

3 讨论

嗜肺军团菌主要引起医源性肺炎、社区获得性肺炎和旅行相关性肺炎, 有研究显示约 8%~13% 的社区获得性肺炎是由军团菌引起的^[9]。军团菌在供水系统和空调系统中较为常见, 由于冷却塔水温较高, 不常清洗, 容易成为军团菌滋生的场所, 而中央空调冷却塔是空调系统中唯一与外界相通的部分, 大型鼓风机易将冷却塔水中污染的军团菌形成气溶胶, 从而形成感染, 因此从空调系统、冷却塔和供水系统中分离出的军团菌可能是引起军团菌病的潜在传染源^[7]。

尽管传统的血清分型方法能将军团菌分为 70 多个血清型, 将 Lp1 军团菌分为 10 个亚型^[10], 但是仅仅依靠血清分型来追溯暴发的来源仍存在困难。近年来, 多种基因分型的方法被应用于军团菌的流行病学分型, 包括扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、PFGE、多位点串联重复序列多态性 (multiple loci VNTR analysis, MLVA) 和多序列基因分型 (sequence-based typing, SBT), 其中 PFGE 由于其高分辨力和高稳定性, 已被应用到对医源性军团菌感染的调查中^[5]。本实验采用 PFGE 分型技术, 对从上海市公共场所中央空调冷却塔水中分离到的 Lp1 军团菌菌株进行分型, 按相似性系数 100% 分型, 26 株军团菌可分成 15 种 PFGE 型。大部分菌株间相似性系数差异明显, 无优势型别, 可见菌株间亲缘关系较远, 提示上海市中央空调冷却塔水系中 Lp1 军团菌分离株存在广泛的遗传多样性。

从图 2 中可知, 经 PFGE 分型, 大部分的 PFGE 型别是由同一场所来源的军团菌菌株组成, 但 LPAs.SH0011 由来自不同地区不同场所的 4 株菌株组成, 这种现象虽较为少见, 但国外亦有类似的报道^[11], 提示该 PFGE 型的军团菌在上海可能具有更广的分布区域, 需要在更广的范围内采样来进行证实。不同地区的不同场所之间存在相同 PFGE 型别的军团菌, 菌株亲缘关系接近, 提示上海市中央空调冷却塔水系之间存在军团菌交叉污染的可能性。大部分同一场所来源的军团菌菌株属于相同的 PFGE 型, 但来源于静安区酒店 II 的 0002、0008、0020、0021

号菌株分属于 4 个 PFGE 型, 相似性系数在 36.95%~60.01% 之间。来自相同地区同一场所的军团菌之间, 酶切图谱不一致, 提示在同一冷却塔水系统中可能存在两种或以上 PFGE 型别的军团菌, 若采用传统的血清学分型方法, 对于类似情况则只能将其归为同一种型别, 无法获取对该水系的更多流行病学资料。从表 2 中得知, 对于来自同一地区的菌株, 其相互间相似性系数从 30.00% 到 100.00% 不等, 各菌株间亲缘关系较远, 无优势菌株。

通过近年来对上海市外环境水中军团菌的监测工作, 本实验发现军团菌在本市普遍存在, 且以 Lp1 型为优势血清型, 尽管近年国内尚无军团菌临床病例的实验室确诊报道, 但是不可轻视其潜在危险。据国外报道, 有 50% 的军团菌临床分离株与环境分离株具有相同的基因型别^[12], 本实验首次将 PFGE 分型技术应用于上海市军团菌环境分离株的基因分型, 希望能够提供更为丰富的军团菌资料, 并在分子水平对环境军团菌进行监测。

参考文献:

- [1] YU VL, PLOUFFE JF, PASTORIS MC, et al. Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey[J]. J Infect Dis, 2002, 186(1): 127-128.
- [2] FERNANDEZ JA, LOPEZ P, OROZCO D, et al. Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21(10): 729-735.
- [3] FORMICA N, TALLIS G, ZWOLAK B, et al. Legionnaires' disease outbreak: Victoria's largest identified outbreak[J]. Commun Dis Intell, 2000, 24(7): 199-202.
- [4] SANCHEZ I, GARCIA-NUNEZ M, RAGULL S, et al. Genotypic variability and persistence of Legionella pneumophila PFGE patterns in 34 cooling towers from two different areas[J]. Environ Microbiol, 2008, 10(2): 395-399.
- [5] SABRIA M, YU VL. Hospital-acquired legionellosis: solutions for a preventable infection[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(6): 368-373.
- [6] SCHWARTZ DC, CANTOR CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. Cell, 1984, 37(1): 67-75.
- [7] GARCIA-NUNEZ M, SOPENA N, RAGULL S, et al. Persistence of Legionella in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008, 52(2): 202-206.
- [8] ZHOU HJ, REN HY, ZHU BQ, et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of Legionella pneumophila[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(5): 1334-1340.
- [9] BRAUN JJ, De GRAAFF CS, De GOEY J, et al. Community-acquired pneumonia: pathogens and course in patients admitted to a general hospital[J]. Ned Tijdschr Geneesk, 2004, 148(17): 836-840.
- [10] JOLY JR, MCKINNEY RM, TOBIN JO, et al. Development of a standardized subgrouping scheme for Legionella pneumophila serogroup 1 using monoclonal antibodies[J]. J Clin Microbiol, 1986,

23(4): 768-771.

- [11] LAWRENCE C, REYROLLE M, DUBROU S, et al. Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(8): 2652-2655.

- [12] Den BOER JW, BRUIN JP, VERHOEF LP, et al. Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(5): 459-466.

(收稿日期: 2009-11-11)

(编辑: 王晓宇; 校对: 丁瑾瑜)

(上接第 355 页)

感染^[2, 11], 两种因素相互促进, 加速癌症患者的死亡进程。

本研究显示 NO₂ 日平均浓度与居民恶性肿瘤死亡率之间呈负相关, 从理论上难以解释, 加之目前有关这方面的报道较少, 所以本次研究得到有关 NO₂ 的结果是该地区客观规律的反映还是受其他混杂因素的影响, 值得进一步分析和探讨。

此次研究结果表明居民恶性肿瘤死亡率与大气污染物浓度存在线性回归。从标化后的偏回归系数可以得出, 自变量 SO₂ 浓度对应变量恶性肿瘤死亡率的影响最大。SO₂ 对机体的损伤机制除了氧化应激理论外, 还通过影响细胞膜上的离子通道的活性而对组织产生不利影响^[12]。长期吸入低浓度的 SO₂ 等大气污染物, 容易损伤婴幼儿等易感人群的免疫屏障, 影响系统的正常功能; 对于患慢性病的群体, 则可加重疾病症状, 甚至死亡, 导致死亡率上升。所以控制该地区 SO₂ 的污染水平对降低该地区居民恶性肿瘤死亡率至关重要。

目前我国有关大气污染物人群健康效应的系统研究还较少, 尤其在空气质量相对较好的地区这方面的研究更鲜见。本研究分析低污染地区人群恶性肿瘤死亡率与大气污染水平的关系, 探讨空气主要污染物对人群恶性肿瘤死亡率的影响, 积累不同污染地区人群恶性肿瘤流行病学数据和资料, 为研究空气中主要污染物在恶性肿瘤发生发展中的作用及致病机制奠定基础, 也为进一步完善空气质量标准、制定科学的空气污染防治规划、保护人群健康提供科学依据。

参考文献:

- [1] DOMINICI F, MCDERMOTT A, DANIELS M, et al. Revised analyses of the national morbidity, mortality, and air pollution study: mortality among residents of 90 cities[J]. J Toxicol Environ Health A, 2005, 68(13/14): 1071-1092.
- [2] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 191-198.
- [3] VALAVANIDIS A, FIOTAKIS K, VLACHOGIANNI T. Airborne

particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms[J]. J Environ Sci Health, Part C: Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2008, 26(4): 339-362.

- [4] Institute de Veille Sanitaire. Health impact assessment of air pollution and communication strategy; third-year report[R/OL]. [2009-11-03]. <http://www.apheis.net/vfbisnvsApheis.pdf>.
- [5] 张文彤. 世界优秀统计工具 SPSS 11.0 统计分析教程(高级篇)[M]. 北京: 北京希望电子出版社, 2002: 250-289.
- [6] BIGGERI A, BELLINI P, TERRACINI B. Meta-analysis of the Italian studies on short-term effects of air pollution-MISA 1996-2002[J]. Epidemiol Prev, 2004, 28(4-5 Suppl): 4-100.
- [7] KATSOUYANNI K, PERSHAGEN G. Ambient air pollution exposure and cancer[J]. Cancer Causes Control, 1997, 8(3): 284-291.
- [8] LEWTAS J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects[J]. Mutat Res, 2007, 636(1-3): 95-133.
- [9] GRANT W B. Air pollution in relation to U.S. cancer mortality rates: an ecological study; likely role of carbonaceous aerosols and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Anticancer Res, 2009, 29(9): 3537-3545.
- [10] YANG W, OMAJE S T. Air pollutants, oxidative stress and human health[J]. Mutat Res, 2009, 674(1/2): 45-54.
- [11] 杨建文, 郑慧芳, 张胜林, 等. 兰州市 2000 和 2004 年大气污染物中 SO₂、NO₂ 和 TSP 浓度变化对健康人群的影响[J]. 职业与健康, 2008, 24(19): 2072-2073.
- [12] 孟紫强, 聂爱芳, 桑南, 等. SO₂ 衍生物对大鼠神经元和心肌细胞几种离子通道的影响[J]. 生态毒理学报, 2006, 1(2): 34-36.

(收稿日期: 2009-11-03)

(编辑: 徐新春; 校对: 洪琪)