

副溶血弧菌的多位点可变数目串联重复序列分型方法的研究

张金金 李迎慧 石晓路 邱亚群 林一曼 陈琼城 姜伊翔 扈庆华 李连青

基金项目: 国家科技重大专项课题(2012ZX10004215)

作者单位: 030001 太原市, 山西医科大学研究生院(张金金)

518055 深圳市, 深圳市疾病预防控制中心(李迎慧 石晓路 邱亚群 林一曼 陈琼城 姜伊翔 扈庆华)

030012 太原市, 山西省临床检验中心(李连青)

通讯作者: 李连青, E-mail: sxllq@tom.com

【摘要】 目的 评价多位点可变数目串联重复序列分析(multiple locus variable number tandem repeat assay, MLVA)方法对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)的分型能力, 初步了解中国深圳地区 VP 分离菌株可变数目串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)的基因分布特征。方法 依据血清型和脉冲场凝胶电泳分析型别选择 2006 年-2011 年分离自临床和食品中的 108 株 VP 菌株。采用 MLVA 方法对其进行基因分型, 评价该方法对 VP 菌株 8 个 VNTR 位点的分型能力。结果 MLVA 8 个位点将 108 株 VP 菌株分为 101 个型别, 分辨系数为 99.86%; 将主流血清型 O3:K6 共 46 株菌分为 44 个型别, 分辨系数为 99.71%。MLVA 8 个位点的多态性都较好(DI 均 > 0.60), 各位点多态性指数由高到低, 依次为 TR7, TR4, TR10, TR2, TR1, TR8, TR5, TR9。结论 MLVA 8 个位点的联合应用适合于对 VP 菌株的分型。MLVA 对 VP 的分型研究具有很好的应用前景。

【关键词】 副溶血弧菌; 脉冲场凝胶电泳; 多位点可变数目串联重复序列分析; 可变数目串联重复序列; 基因型

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2012.04.004

Study of *Vibrio parahaemolyticus* of multiple locus variable number tandem repeat analysis

ZHANG Jin-jin¹, LI Ying-hui², SHI Xiao-lu², et al. ¹Graduate Department of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China ²Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

【Abstract】 Objective To provide accurate molecular typing method for tracking the source of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) infection cases by evaluating the discrimination ability of multiple locus variable number tandem repeat assay (MLVA), and understanding preliminarily variable number tandem repeat (VNTR) gene distribution characteristics of VP. **Methods** 108 VP strains were isolated from clinical and food according to serotype and pulse field gel electrophoresis analysis type from 2006 to 2011. The genotype of VP strains were analyzed by MLVA method. And the genotype capacity to 8 VNTR sites of VP strains by MLVA methods were evaluated. **Results** The 108 VP strains were divided into 101 MLVA types and 46 strains O3:K6 serum type were divided into 44 MLVA types with 8 VNTR sites. The resolving coefficient were 99.86% and 99.71%. The discrimination ability of MLVA with 8 VNTR sites were better (DI all > 0.60). The polymorphism index from high to low were TR7, TR4, TR10, TR2, TR1, TR8, TR5 and TR9. **Conclusion** The combination of MLVA's 8 sites for VP strain's genotype are suitable. There is a good application prospect of MLVA for tracking the source of VP infections.

【Key words】 *Vibrio parahaemolyticus*; PFGE; MLVA; VNTR; Genotype

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种嗜盐性细菌^[1], 广泛分布于食品、海水等环境中。VP 所致的食源性感染疾病或食源性疾病暴发中毒主要是由于摄入了被 VP 污染的食品而引起。在我国沿海地区, 食源性疾病暴发事件中, VP 引起的暴

发事件大约占 60%, 2007 年-2011 年深圳市感染性腹泻实验室监测数据显示 VP 是引起深圳市感染性腹泻的首要病原菌, 高峰期阳性率超过 30%, 占有分离致病菌的 51.48%^[2,3]。深圳市食品安全风险监测数据显示, VP 分布于海产品、肉类、水产品等食

品中,VP 交叉污染严重^[3]。因此,开展人群中 VP 分子分型监测和食品监测,分析不同来源菌株之间的同源性,加强传染来源的追踪溯源有助于对 VP 感染病例的控制。

目前对细菌分型的溯源技术有血清型分型和分子分型等方法。血清型分型方法基于表型分型,分型能力不足;分子分型方法基于细菌基因水平的分型,遗传识别能力强。目前应用于 VP 菌株的基因分型研究,包括限制性片段长度多态性分析、随机扩增多态性分析、多位点序列分析和脉冲场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis, PFGE)分析等。PFGE 已被公认为细菌分子分型的金标准。多位点可变数目串联重复序列分析(multiple locus variable number tandem repeat assay, MLVA)是一种快速的分析多位点串联重复序列的新方法,它以 PCR 技术为基础,可确定多个可变数目串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)位点的数目,是推断同种细菌菌株间基因关系的一种有力方法,不同的临床分离株可表现为不同的串联重复数,故 MLVA 结果可以数字化表示,便于不同实验室内进行比较,是近几年发展的细菌二代分子分型方法。MLVA 方法相对于 PFGE 方法,操作更简单,成本更低廉,结果更直观、准确^[4]。MLVA 现已成功应用于炭疽杆菌、鼠疫耶尔森氏菌和结核分枝杆菌等病原菌的分子分型。MLVA 方法与 PFGE 方法的高符合率在国外^[5]已被证实。近两年来,MLVA 开始应用于 VP 的分型研究,但目前国内尚未见 VP 的 MLVA 分型报道。本文选取 108 株分离自临床和食品中的 VP 菌株进行 MLVA 分型研究,初步探讨 MLVA 方法用于我国 VP 菌株分型的可行性,更全面地对 VP 的基因变化实行动态分析,为 VP 的主动监测和传染源溯源提供更好的依据。

1 材料与方 法

1.1 对象 依据血清型和 PFGE 型别不同(根据时间和地点来源选择跨度大的菌株),选取了 108 株分离自临床和食品中的 VP 菌株包含 22 种常见血清型以及 68 种 PFGE 型别的 VP 菌株进行研究,其中 95 株为深圳市感染性腹泻监测网来源菌株,8 株为食源性疾病暴发来源菌株,5 株为食品来源菌株。108 株 VP 中,2006 年 2 株,2007 年 18 株,2008 年 13 株,2009 年 11 株,2010 年 17 株,2011 年 47 株。其中菌株数大于 1 的血清型有 12 种,分别为 O3:K6(46 株)、O4:K8(13 株)、O1:K25(8 株)、O3:K29(8 株)、O4:68(5 株)、O1:K36(4 株)、O4:K13(3 株)、O4:

K9(3 株)、O8:K21(2 株)、O1:K56(2 株)、O5:K17(2 株)和 O1:K41(2 株)。VP 菌株数各 1 株的血清型有 10 种,分别为 O4:K12、O3:K1、O4:K11、O3:K41、O4:K55、O5:K68、O3:KUT、O1:K69、O6:K18 和 O2:K3。分布情况见表 1。

1.2 方 法

1.2.1 主要仪器与试剂 凝胶成像系统为 BIO-RAD 公司生产的 Quantity One 4.4.0,分析软件为上海 EP 科技有限公司生产的 BioNumerics 5.1 软件。所用试剂材料为 Takara 公司的 100 bp DNA Ladder Marker、北京 SBS 基因技术公司的 Gold-View DNA 染料、Promega 公司的 Go Taq Green Master Mix 和 Takara 公司的 Agarose Regular。

1.2.2 菌株鉴定 108 株 VP 中,98 株为 tdh (+)tlh (+)trh (-)基因型,8 株为 tdh (-)tlh (+)trh (-)基因型,2 株为 tdh (+)tlh (+)trh (+)基因型。所有 VP 菌株都参照国家标准 GB/T 4789.7-2003 方法进行复核鉴定,并用日本生研株式会社生产的诊断血清进行分型鉴定。方法为首先在三糖铁琼脂斜面培养基上接种 VP 并过夜培养,进行 K 型血清鉴定。然后取斜面上剩下的菌苔与灭菌水混匀制成菌悬液,121 ℃ 干浴 1 h,以破坏 K 抗原,干浴后以离心半径 8.04 cm,10 000 r/min 离心 5 min,弃部分上清液,将余下的 100 μl 上清液与沉淀物振荡混匀,用于 O 型血清的鉴定。

1.2.3 MLVA 分型 ①位点选择与引物合成:8 个 VNTR 位点引物序列,参照文献^[6,7]的位点及条件并进行条件优化改善,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成(见表 2)。②反应体系和反应条件:采用 50 μl 反应体系,其中含上下游引物各 1 μl,引物浓度为 10 μmol/mL(TR7 上下游引物各 1 μl,引物浓度为 20 μmol/mL,其终浓度为 0.4 μM,其余引物的浓度均为 0.2 μM),Go Taq Green Master Mix 25 μl, DNA 模板 5 μl,去离子水补足 50 μl。PCR 反应条件包括 A、B、C 三种体系,其中 A 体系为:95 ℃ 预变性 15 min,先 94 ℃ 30 s,62 ℃ 90 s(每循环降低 0.2 ℃),72 ℃ 60 s,20 个循环,接着 94 ℃ 30 s,58 ℃ 90 s,72 ℃ 60 s,20 个循环,最后 60 ℃ 延伸 30 min;B 体系为:95 ℃ 预变性 15 min,94 ℃ 30 s,61 ℃ 90 s,72 ℃ 60 s,30 个循环,最后 60 ℃ 延伸 30 min;C 体系为:95 ℃ 预变性 15 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 90 s,72 ℃ 60 s,35 个循环,最后 60 ℃ 延伸 30 min。③电泳检测并测序分析:取 6~7 μl 扩增产物,在 1.5%的琼脂糖凝胶中电泳,电压为 110 V,电流 400 mA,电泳时间

表 1 108 株 VP 菌株的血清型分布情况

血清型	来源和株数	分离年份	总株数	构成比(%)
O3:K6	患者(41)食源性疾病暴发(4)食品(1)	2006-2011	46	42.59
O4:K8	患者(10)食源性疾病暴发(3)	2007-2009, 2011	13	12.04
O1:K25	患者(6)食源性疾病暴发(1)食品(1)	2006-2008, 2010, 2011	8	7.41
O3:K29	患者(8)	2008, 2010, 2011	8	7.41
O4:K68	患者(5)	2008, 2010, 2011	5	4.63
O1:K36	患者(4)	2010, 2011	4	3.70
O4:K13	患者(3)	2009	3	2.78
O4:K9	患者(3)	2011	3	2.78
O8:K21	患者(2)	2009	2	1.85
O1:K56	患者(2)	2010	2	1.85
O5:K17	食品(2)	2010	2	1.85
O1:K41	患者(2)	2009, 2011	2	1.85
O4:K12	患者(1)	2008	1	0.93
O3:K1	患者(1)	2009	1	0.93
O4:K11	患者(1)	2010	1	0.93
O3:K41	患者(1)	2010	1	0.93
O4:K55	患者(1)	2011	1	0.93
O5:K68	患者(1)	2011	1	0.93
O3:KUT	食品(1)	2011	1	0.93
O1:K69	患者(1)	2011	1	0.93
O6:K18	患者(1)	2009	1	0.93
O2:K3	患者(1)	2008	1	0.93

表 2 8 个 VNTR 位点的引物序列和扩增体系

名称	标准命名	引物	扩增体系
TR1	VPTR7	F-TATCTACAAAGCTGGCGGAGAT R-AAGCTGTTACTTGTCCACACC	A
TR2	VPTR5	F-GCTGGATTGCTGCGAGTAAGA R-AACTCAAGGGCTGCTTCGG	B
TR5	VPTR8	F-ACATCGGCAATGAGCACTTG R-AAGAGGTTGCTGAGCAAGCG	B
TR8	VPTR4	F-AAACGTCTCGACATCTGGATCA R-TGTTTGGCTATCTAACCGCTCA	B
TR9	VPTR3	F-CGCCAGTAATTCGACTCATGC R-AAGACTGTTCGGCTCGCTGA	B
TR10	VPTR6	F-TCTCCATGGTGTCTCTTCCA R-CTTGACTTGCTCGCTCAGGAG	B
TR4	VPTR1	F-aggtgacctatagaataTAACAACGCAAGCTTGCAACG R-gtagactcaclatagggaTCATTCTCGCCACATAACTCAGC	C
TR7	VP2-07	F-aagaagggcagcattcaagTGATTTTGAAGCAGCGAAGA R-ctggttctgattaatctgTTGTGACTGCTGTCTTGC	C

为 40 min, 电泳结束后紫外成像观察结果。用 100 bp DNA Marker 来确定分子量的大小, 然后取 40 μ l 送到英潍捷基公司测序。④指标串联重复数的确定以及聚类分析: 参照 RIMD2210633 全基因组序列, 8

个位点的重复单元保守序列如下: TR1 (CTGCTC), TR2 (CTCAAA), TR4 (CTCTAT), TR5 (CTTCTG), TR7 (AGCAAC), TR8 (GACACA), TR9 (ATCTGT), TR10 (GCTCTG)。导入 Bionumerics 5.1 软件, 采用

Categorical 系数和 uPG-MA 系数进行聚类分析。命名原则依据血清型不同以 M1, M2, M3 依次类推。将数据上传到 V-DICE 网站, 通过采用 Simpson's Diversity 指数^[8,9]同时计算各位点的分辨力。**⑤ MLVA 总分辨力:** 采用 HGI 指数计算该方法总的分辨力, 公式如下。

$$HGI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

注: N 为菌株总数, s 是所用分型方法划分的总类型数, nj 是属于第 j 类型的菌株数

2 结果

2.1 VNTR 位点的评估 随机选取 10 株菌, 对各位点重复 3~5 次扩增, 每次扩增的片段大小及条带的清晰程度完全一致, 并随机挑选 2 个产物进行序列测定, 测序结果显示一致。

2.2 MLVA 分型结果 采用 8 个特异性较好的 VNTR 位点对 108 株 VP 进行 MLVA 分型, 并用 Bionumerics 5.1 软件对 108 株 VP 的 MLVA 结果进行聚类分析。采用 HGI 指数计算得出, 8 个 MLVA 位点将 108 株 VP 分为 101 个型别, 分辨系数为 99.86%; 将主流血清型 O3:K6 共 46 株菌分为 44 个型别, 分辨系数为 99.71%(图 1)。由图 1 可知, 除 VP11157、VP11184、VP11241 聚为一簇, 型别为 MT40, 其余菌株均可被 MLVA 细分, 可见 MLVA 对 VP 菌株的分辨力很高。通过上传数据到 V-DICE 网站计算, 我们得出各个位点的多态性指数, 即分辨力值, 见表 3。由表 3 可知, 各 VNTR 位点呈现不同的等位基因多态性, DI 值越大, 表示遗传意义上的多态性越好。8 个位点的多态性都较好 (DI 均 > 0.60), 各位点多态性指数由高到低, 依次为 TR7, TR4, TR10, TR2, TR1, TR8, TR5, TR9。其中 TR7 位点变异度最高, 而 TR9 位点的变异度则较低, 说明 TR7 位点对 VP 的区分效力要大于 TR9。

3 讨论

近年来, 食源性疾病已经成为影响公众健康的公共卫生突出问题之一^[10]。美国于 1996 年开始建立了 PulseNet 网络, 用于食源性疾病暴发疫情的早期发现和控制。PulseNet 对确定食品污染源, 追踪传播途径, 确定流行范围等发挥着关键性作用, 其旨在保障人体健康和食品安全。随后加拿大、欧洲、亚太地区和 中国也相继建立了各自的 PulseNet。PulseNet 的核心技术是以 PFGE^[11]为代表的分子分型技术, PFGE 具有准确、稳定等优点, 但由于耗时长、操作繁琐等缺陷, 人们开始研究二代分子分型技术, 以

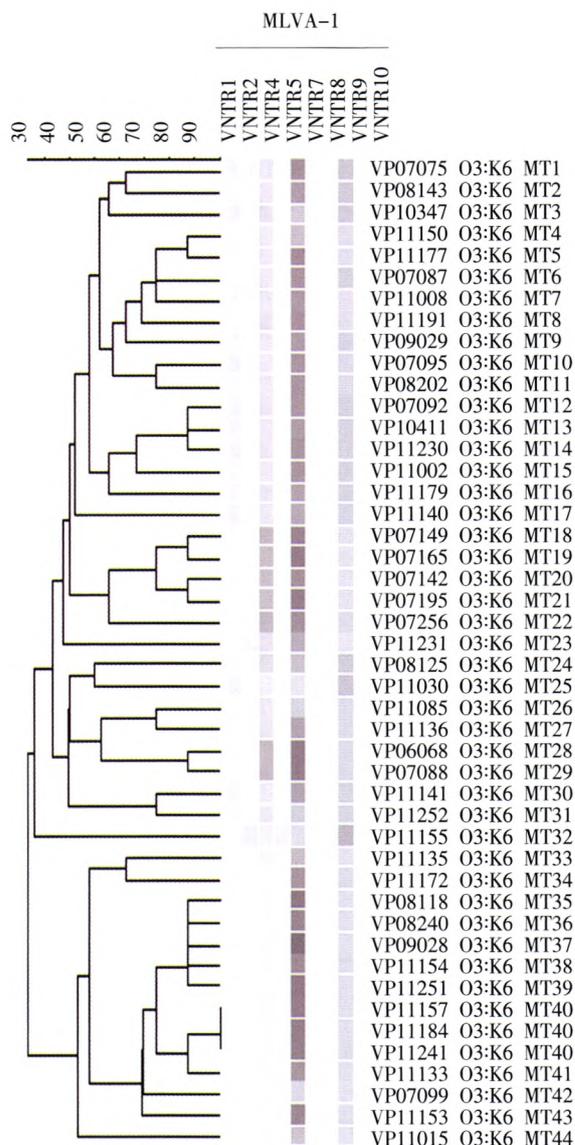


图 1 VP 主流血清型 O3:K6 菌株 8 个 MLVA 位点的聚类分析图

表 3 MLVA 分析方法各位点的多态性指数

位点	DI	K	max(pi)
TR7	0.964	36	0.074
TR4	0.922	18	0.111
TR10	0.919	23	0.139
TR2	0.806	12	0.306
TR1	0.781	8	0.343
TR8	0.749	9	0.435
TR5	0.719	11	0.370
TR9	0.605	12	0.611

注: DI 反映了各位点重复数目的变异度大小, 范围为 0~1; 1 表示完全变异; K 表示样本中各个位点不同重复数目的个数; max(pi) 表示各位点重复数目最频繁出现的样本所占总体样本的比例

MLVA 为代表的二代分子分型技术应运而生。目前

MLVA 方法已经开始成功地用于炭疽杆菌,鼠疫耶尔森氏菌和结核分枝杆菌等其他病原菌的分子分型。近两年来,国外^[9]也开始将 MLVA 方法应用于 VP 的分型研究,但目前国内尚未见有关 VP 的 MLVA 分型报道。本文研究将 MLVA 初步应用于 VP 的分型,为 PulseNet China 提供了深圳地区 VP 的 MLVA 分子分型数据,可以更好地对 VP 进行主动监测和溯源分析,从而为早期传染来源追踪和暴发疫情提供更有力的证据。与 PFGE 相比,MLVA 方法有更多优点:①分型完整,MLVA 对包括 22 种常见血清型的 108 株 VP 菌都能进行分型;②分型更精细;③适合大批量分析,且简单快速,为爆发疫情调查和传染来源追踪节约时间。如 PFGE 整个实验至少需 3 d 以上时间,而且要求必须是纯菌,而 MLVA 从样品处理到检测只需 1~2 d 即可;④更易于标准化^[12]。目前虽然已经建立了 VP 的 PFGE 标准操作流程,但实验繁琐且影响因素较多,耗时耗力;而 MLVA 结果易于分析,有很高的可重复性,便于不同实验室的结果比较;⑤适合于暴发疫情的分析。

深圳地区 VP 近十年的暴发疫情和近 5 年的感染性腹泻监测数据显示,引起 VP 感染暴发和散发的优势血清型主要为 O3:K6、O4:K8、O1:K25、O3:K29、O4:K68、O1:K36 等^[2]。本文研究表明 MLVA 方法能将不同血清型,不同来源的全部 VP 菌株分型,有利于菌株之间的差异性分析。本文研究初步选取了 8 个 VNTR 位点进行评估,其中 TR7 的分辨力高达 0.964,几乎可以鉴定到菌株水平,其多态性最高,但有时分辨力过高可能会对暴发疫情菌株的同源性分析产生影响。另外,本文研究中发现 TR1 位点对于非 O3:K6 血清型的部分菌株,其阳性条带较弱,故推测此位点可能更适合于 O3:K6,但仍需后续实验进一步确证及评估。

本文研究虽然囊括了大部分有代表血清型的人源性菌株,但食品菌株数量偏少,食源性中毒暴发菌株也还未大量分析,还有待分析大量的临床及食品外环境分离株,进一步评价 MLVA 方法。本文研究认为 8 个 MLVA 位点,即 TR1、TR2、TR4、TR5、TR7、TR8、TR9、TR10 的联合应用适合于 VP 菌株的分析,既节省工作量和成本又能保证分型准确。MLVA 方法对 VP 食源性疾病的溯源和预警有很好的应用前景。

4 参考文献

- 1 Vongxay K, Wang S, Zhang X, et al. Pathogenetic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126:71-75.
- 2 兰全学,扈庆华,石晓路,等. 副溶血弧菌脉冲场凝胶电泳技术分子分型分析. *中国公共卫生*, 2007, 23:1183-1184.
- 3 刘涛,房师松,王艺,等. 一起副溶血性弧菌食物中毒的溯源及毒力基因研究. *中国热带医学*, 2010, 10:1183-1184.
- 4 陈志,郑幸福,陈佳,等. 结核分支杆菌基因分型技术的应用研究进展. *重庆医学*, 2009, 38:2240-2242.
- 5 Teh CS, Chua KH, Thong KL. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* in comparison with pulsed field gel electrophoresis and virulotyping. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 2010: 817910.
- 6 Kimura B, Sekine Y, Takahashi H, et al. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. *J Microbiol Methods*, 2008, 72:313-320.
- 7 Harth-Chu E, Espejo RT, Christen R, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75:4079-4088.
- 8 Chen YY, Chang JR, Huang WF, et al. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on SNP and VNTR typing profiles in Asian countries. *PLoS One*, 2012, 7:e39792.
- 9 Olsen JS, Aarskaug T, Skogan G, et al. Evaluation of a highly discriminating multiplex multi-locus variable-number of tandem-repeats (MLVA) analysis for *Vibrio cholerae*. *J Microbiol Methods*, 2009, 78: 271-285.
- 10 Greig JD, Ravel A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *Int J Food Microbiol*, 2009, 130: 77-87.
- 11 Mirza S, Kariuki S, Mamun KZ, et al. Analysis of plasmid and chromosomal DNA of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar typhi from Asia. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:1449.
- 12 Volpe Sperry KE, Kathariou S, Edwards JS, et al. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis as a Tool for Subtyping *Listeria monocytogenes* Strains. *J Clin Microbiol*, 2008, 46:1435-1450.

(收稿日期:2012-10-12)

(本文编辑:李霖)