

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01241

潜水人群铜绿假单胞菌基因多位点序列遗传分型

陈双红*, 陈锐勇, 陈海庭, 徐雄利, 李 慈

海军医学研究所舰艇卫生研究室, 高压与潜水生理学全军重点实验室, 上海 200433

[摘要] **目的** 研究海军潜水人群铜绿假单胞菌分离株的遗传基因型, 明确海军潜水人群铜绿假单胞菌携带株的流行特征。**方法** 用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)技术, 以铜绿假单胞菌7个管家基因 *acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA* 和 *trpE* 内部特定核酸片段作检测靶, 对随机抽样海军潜水员携带的64株铜绿假单胞菌进行目的基因扩增和测序, 应用 *Pseudomonas aeruginosa* MLST 数据库对测序结果进行分析, 以获得检测靶基因的多位点序列信息; 应用 Bionumerics 4.0 的 LIAN, SplitsTree 和 eBURST 分析程序对获得的 MLST 进行进一步的生物信息学分析, 以获得流行株的遗传特征。**结果** 64株铜绿假单胞菌中53株可分为19个ST型, 11株未能分型; 其中ST274和ST260是优势克隆株, 分别占18.75%(12/64)、15.62%(10/64)。**结论** 海军潜水人群携带的铜绿假单胞菌具有遗传多样性和优势基因型, MLST分型对于研究海军潜水人群携带的铜绿假单胞菌遗传差异与流行特征具有重要意义。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 多位点序列分型; 基因型; 潜水

[中图分类号] R 378.991 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)11-1241-04

Multilocus sequence typing scheme of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from naval divers

CHEN Shuang-hong*, CHEN Rui-yong, CHEN Hai-ting, XU Xiong-li, LI Ci

Department of Ship Sanitation, PLA Key Laboratory of Hyperbaric and Diving Physiology, PLA Institute of Naval Medicine, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the genetic phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from naval divers, so as to obtain the epidemic character of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in different naval divers. **Methods** A total of 64 *Pseudomonas aeruginosa* strains from naval divers were sequenced by multilocus sequence typing (MLST) using 7 house-keeping genes: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* and *trpE*. The sequencing results were analyzed based on *Pseudomonas aeruginosa* international MLST database to obtain the allelic profiles and sequence types (STs). MLST data were analyzed by Bionumerics 4.0 (<http://pubmlst.org/mlstanalyse>) using LIAN, SplitsTree and eBURST. **Results** Data from MLST revealed a high diversity among the strains. Out of the 64 strains, 53 strains could be assigned to 19 STs and 11 could not be assigned. ST274 and ST260 were the dominant strains, with ST274 accounting for 18.75% (12/64) and ST260 accounting for 15.62% (10/64). **Conclusion** *Pseudomonas aeruginosa* strains in naval divers have high diversity and preponderant genotypes. MLST is of great significance for *Pseudomonas aeruginosa* genomic study and epidemiology surveillance.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; multilocus sequence typing; genotype; diving

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(11):1241-1244]

铜绿假单胞菌感染常见于肺囊性纤维化、烧伤和免疫缺陷等患者, 健康人群感染极少见^[1]。然而调查研究^[2-4]表明: 高压潜水作业环境下铜绿假单胞菌致病率极高, 资料显示潜水员外耳道炎、皮肤粘膜感染几乎都为铜绿假单胞菌, 极少伴有其他致病菌的合并感染。本课题组对我国主要潜水基地北部海域潜水员和相关装备进行微生物谱抽样调查, 结

果显示我海军潜水环境和人员铜绿假单胞菌检出率较高, 潜水员相关疾病嗜患率高, 分离菌株耐药性出现频繁^[5-8]。因此, 高压潜水环境中铜绿假单胞菌的高感染、难治疗和难消除已经严重影响潜水职业人员的身体健康。

环境胁迫是细菌进化的重要诱因, 而细菌进化的实质是遗传物质发生变化的结果^[9]。分子分型技术

[收稿日期] 2012-07-02 **[接受日期]** 2012-10-29

[基金项目] 国家自然科学基金(81271796), 上海市自然科学基金(09ZR1421000), Supported by National Natural Science Foundation of China (81271796) and Natural Science Foundation of Shanghai (09ZR1421000).

[作者简介] 陈双红, 博士, 副研究员。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81883215, E-mail: chen127shh@sina.com

从基因差异上区分菌株从而能更准确判断其遗传进化规律,是细菌遗传流行病学研究的重要手段。而其中多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 技术是高通量测序技术与成熟的群体遗传学技术相结合的产物,是细菌感染的流行病学调查和感染人群结构调查的非常有价值的工具,能为进一步判断感染细菌发病趋势和从分子水平研究其致病性机理提供依据。2004 年 Barry 等^[10] 成功将该技术用于铜绿假单胞菌遗传分型,结果表明 MLST 遗传溯源技术的应用使得对临床环境铜绿假单胞菌感染株来源、流行趋势及毒力进化变异特点的分析更为准确,能为防治技术的研究提供更合理的基础理论。

然而,尽管铜绿假单胞菌在潜水人群职业性感染高发,但至今未有对其流行特点的系统研究。故,本研究采用 MLST 技术对随机分离自海军潜水人群的 64 株铜绿假单胞菌进行遗传学分型,以明确海军潜水人群携带铜绿假单胞菌的主要基因型和优势克隆群,为进一步研究感染高发机制和控制技术提供基础信息。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 铜绿假单胞菌标准菌株 PAO1 (ATCC 15692),购自美国组标准生物品收藏中心。铜

绿假单胞菌分离菌 64 株,主要来自中国潜水作业频繁的北部海域潜水员外耳及呼吸道采样分离样本。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组抽提试剂盒、PCR 试剂、各种分子生物学操作酶类均购自 TaKaRa 公司; LB 培养基、铜绿假单胞菌分离用乙酰胺培养基和绿脓菌素测定用培养基均购自上海科玛嘉公司,其他生化试剂均购自国药集团上海分公司及上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.2 铜绿假单胞菌的分离鉴定 参照文献^[11]绿脓杆菌的鉴定方法,64 株细菌由本实验室鉴定完成^[12]。

1.3 铜绿假单胞菌 ST 等位基因选择、靶基因序列扩增及序列信息处理 按参考文献^[10]选择铜绿假单胞菌的 7 个保守基因 *acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA* 和 *trpE* 作为本研究的目的基因。铜绿假单胞菌基因组 DNA 抽提参照试剂盒的标准操作进行。目标片段 DNA 序列扩增和测序引物设计参考 *Pseudomonas aeruginosa* MLST 网站信息,引物合成委托上海生工生物工程技术服务有限公司完成。PCR 扩增采用 50 μ l 反应体系,反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 DNA 凝胶电泳鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果经 DNAMAN 软件拼接,进行 BLAST 比对验证。序列属性正确后的数据进行 ST 数据分析。目标基因选择及引物信息见表 1。

表 1 MLST 扩增和测序用引物

Tab 1 Primers used for MLST

Locus and function	Primers sequence (5'-3')		Size (bp)	
	Forward	Reverse		
<i>acsA</i>	Aplification	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	842
	Sequencing	GCCACACCTACATCGTCTAT	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC	390
<i>aroE</i>	Aplification	TGGGGCTATGACTGGAACCC	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	825
	Sequencing	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	498
<i>guaA</i>	Aplification	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	940
	Sequencing	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC	GACGTTGTGGTGGCAGCTTGA	373
<i>mutL</i>	Aplification	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	940
	Sequencing	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	442
<i>nuoD</i>	Aplification	ACCGCCACCCGTA CTG	TCTCGCCCATCTTGACCA	1 042
	Sequencing	ACGGCGAGAACGAGGACTAC	TGGCGGTCGGTGAAGGTGAA	366
<i>ppsA</i>	Aplification	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	GGGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG	989
	Sequencing	GGTGACGACGGCAAGCTGTA	GTATCGCCTTCGGCACAGGA	370
<i>trpE</i>	Aplification	GCGGCCAGGGTCGTGAG	CCCGCGCTTGTTGATGGTT	811
	Sequencing	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	GGTGTCATGTTGCCGTTCC	443

1.4 铜绿假单胞菌 ST 数据分析 将扩增的 64 株铜绿假单胞菌 7 组 ST 标签序列信息上传至 *Pseudomonas aeruginosa* MLST Database (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) 进行 multiple locus query 分析。然后将获得的 ST 分类数据信息上传至 Pub

MLST Data Analysis (<http://pubmlst.org/mlstanalysis/>) 进行 LIAN, SplitsTree 和 eBURST 分析。

2 结果

2.1 目标标签序列扩增及测序验证结果 PCR 扩

增结果显示, 分离的 64 株铜绿假单胞菌均可以扩增出 7 组标签序列的特异性产物, 产物大小范围为 811~1 024 bp, 扩增产物的 DNA 电泳验证结果见图 1A。应用测序引物对 DNA 电泳验证正确的目

标片段进行进一步测序验证, 测序结果用 DNA-MAN 拼接后上传至 PubMed 进行 BLAST 比对。DNA 序列比对结果显示目标片段与标准株 PAO1 等位基因的符合率达 97.60% 以上。

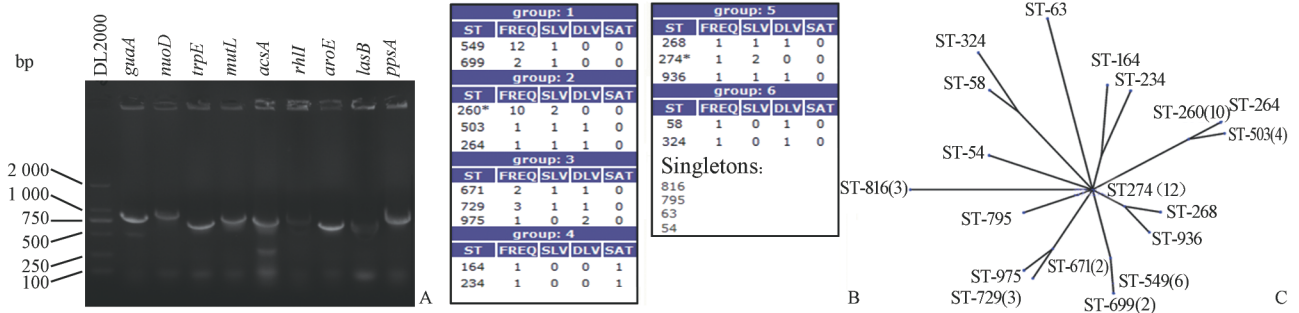


图 1 53 株潜水人群铜绿假单胞菌 MLST 分型数据

Fig 1 Bioinformatics analysis of sequence types of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in naval divers

A: DNA electrophoresis verification of *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* and *trpE* PCR products; B: eBURST analysis; C: SplitsTree analysis. The numbers in C indicate the number of strains

2.2 铜绿假单胞菌分离株等位基因信息及 ST 分型结果 64 株铜绿假单胞菌中 53 株可分为 19 个 ST 型, 11 株未能分型。其中 ST274 型占 18.75% (12/64), ST260 型占 15.62% (10/64)。53 株菌 19 个 ST 型的 7 组等位基因中数量最多的是 *guaA* 基因, 为 11 个; 其次是 *ppsA*、*acsA*、*mutL* 和 *trpE* 基因, 分别为 9、7、6、6 个; 较少的是 *aroE* 和 *nuoD* 基因, 分别为 5、4 个。同一扩增体系中等位基因的数量反映该基因的多样性, 该结果显示 *aroE* 和 *nuoD* 基因变化最少、相对稳定, 结果见表 2。

2.3 铜绿假单胞菌不同 STs 相似度、变异性 and 进化关系分析 用连锁分析工具 LIAN 对 53 株野生型铜绿假单胞菌 STs 型的等位基因型进行连锁不平衡分析, 结果显示: V_D 为 4.36, V_E 为 1.33, SI_A 为 0.37; 7 个位点的平均遗传多态性 (mean genetic diversity) H 值为 0.64 ± 0.08 ; 单个位点 *acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA* 和 *trpE* 的遗传多态性分别为 0.78、0.21、0.82、0.63、0.61、0.82 和 0.59。因为 H 数值大小与基因变异程度正相关, 故 *aroE* 在 7 组等位基因多态性变异程度最小。

表 2 野生型铜绿假单胞菌 MLST 分型结果

Tab 2 MLST type of wildtype *Pseudomonas aeruginosa*

ST	Allele						
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
ST-729	5	5	57	13	24	4	3
ST-234	1	5	11	3	4	10	3
ST-671	5	5	57	13	1	74	3
ST-975	23	5	57	13	4	74	3
ST-324	4	11	3	13	1	2	4
ST-58	4	5	16	13	1	2	4
ST-699	7	5	7	3	4	1	7
ST-549	7	5	12	3	4	1	7
ST-268	23	5	70	7	1	12	7
ST-936	23	5	11	7	20	12	7
ST-260	14	5	10	7	4	13	7
ST-264	14	63	10	7	4	13	7
ST-795	23	5	12	30	1	4	10
ST-164	1	5	1	11	4	10	10
ST-54	2	5	12	11	4	4	16
ST-816	5	1	65	13	10	7	23
ST-503	14	5	10	7	4	13	74
ST-63	5	4	21	5	1	6	80
ST-274	23	5	11	7	1	12	7

用 eBURST 聚类分析工具对 19 个 ST 型进行分析, 聚类的标准为 7 个 ST 标签基因中有 4 个亚型相同, 则规定为一个复合克隆群。结果表明 19 个 ST 型可分为 6 个复合克隆群和 4 个独立单态群, 并形成了分别以 ST260、ST274 为中心优势 ST 型的两个核心复合克隆系, 见图 1B。

为了更好分析测得的各 ST 型的特点, 用 Prim's 算法对 19 组 ST 型数据进行分裂分解分析 (split decomposition analysis), 得到最小生成树 (minimum-spanning tree), 用结点之间的边权值来表示对象之间的相似度 (图 1C)。结果与 eBURST 聚类分析结果高度一致。

3 讨论

国外研究资料^[2-4]表明: 职业潜水人员皮肤黏膜和伤口感染细菌具有明显的专属性, 铜绿假单胞菌是导致皮肤、黏膜感染的唯一细菌种类。Ahlén 等^[3]连续 15 年跟踪挪威北部海域海水分离样本、潜

水器细菌样本和同期作业人员细菌分离样本,用血清学分型结合脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术,证实人员感染铜绿假单胞菌与当地海域分离样本同源,认为海水生长的铜绿假单胞菌是人员感染的重要来源。PFGE分型技术用于细菌溯源分析具有极高的灵敏度,但铜绿假单胞菌基因组随环境压力变化表现出极强的变异性,从而可能导致同一来源菌株由于基因组的高度变异而被区分为不同来源,因而不适用于潜水环境铜绿假单胞菌全面的感染源调查和系统进化变异分析。1998年 Maiden 等^[13]首次建立以 7~8 个细菌高度保守的看家基因作为序列标签(MLST)的遗传分子流行病学溯源技术,2004年 Barry 等^[10]成功将该技术用于铜绿假单胞菌遗传分型。MLST 遗传溯源技术的应用,使得对潜水环境铜绿假单胞菌感染株来源、流行趋势及毒力进化变异特点的分析更为准确。

我国职业潜水员铜绿假单胞菌携带检出率高,但至今未有系统的关于其在潜水职业中感染高发的致病机制和流行病学研究报道。本研究首次对我国北部海域职业潜水员携带的铜绿假单胞菌分离株进行 MLST 遗传学分型。分型结果表明潜水作业及训练频度高的北部海域形成了以 ST260 和 ST274 序列型为中心的两个优势克隆群。本研究小组在另一个研究过程中发现,由于该地区 1 名潜水员携带铜绿假单胞菌,导致在 450 米饱和潜水载人实验共同作业的 2 名潜水员交叉感染。经 MLST 遗传分型显示为同一遗传基因型 ST503 型(ST503 型与 ST260 型属同一优势克隆群细菌),并且在同期的饱和舱空气采样标本中检出大量同一 ST 型细菌。该结果提示,海军潜水人群铜绿假单胞菌的高携带率和优势感染菌株的出现可能与共同作业环境中人员的密切接触传播和空气传播途径密切相关^[5]。

临床细菌感染优势菌株的产生,是长期感染环境选择性胁迫细菌种群进化的必然结果^[9,14]。随宿主感染环境变化而进行有利于种群生长需求的表型适应性调控,是铜绿假单胞菌最显著的特点^[15-16]。国内、外已有研究结果表明氮氧饱和和高气压暴露潜水作业环境对铜绿假单胞菌生物学行为有明显的诱导作用^[2,6-8]。因此,对潜水员携带的铜绿假单胞菌进行遗传学分型,将对揭示其传播途径、感染流行特点具有重要意义,也将为潜水职业性感染高发的预防控制研究提供重要的流行病学依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Hassett D J, Sutton M D, Schurr M J, Herr A B, Caldwell C C, Matu J O. *Pseudomonas aeruginosa* hypoxic or anaerobic biofilm infections within cystic fibrosis airways[J]. Trends Microbiol, 2009, 17: 130-138.
- [2] Ahlén C. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in an heliox atmosphere[J]. Undersea Biomed Res, 1989(Suppl 15): 1-103.
- [3] Ahlén C, Mandal L H, Iversen O J. An in-field demonstration of the true relationship between skin infections and their sources in occupational diving systems in the North Sea[J]. Ann Occup Hyg, 2003, 47: 227-233.
- [4] Hind J, Attwell R W. The effect of antibiotics on bacteria under hyperbaric conditions[J]. J Antimicrob Chemother, 1996, 37: 253-263.
- [5] 陈双红, 陈锐勇, 肖存杰, 田力, 徐雄丽, 武文斌, 等. 模拟 480 m 氮氧饱和潜水实验室微生物污染及评价研究[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2012, 19: 73-76.
- [6] 陈双红, 陈锐勇, 肖卫兵, 徐雄丽, 武文斌, 巴剑波. 氮氧饱和和高气压暴露对铜绿假单胞菌毒力表型的影响研究[J]. 微生物学杂志, 2011, 31: 64-68.
- [7] 陈双红, 陈锐勇, 徐雄利, 李慈, 肖卫兵. 氮氧饱和和高气压暴露对铜绿假单胞菌 PAO1 基因表达的诱导调节[J]. 微生物学通报, 2011, 38: 1546-1553.
- [8] Chen S H, Chen R Y, Xu X L, Xiao W B. Microarray analysis and phenotypic response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under hyperbaric oxyhelium conditions[J]. Can J Microbiol, 2012, 58: 158-169.
- [9] Lei Y, Jelsbak L, Rasmus L M, Søren D, Christopher T W, Martin H R, et al. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment[J]. PNAS, 2011, 108: 7481-7486.
- [10] Barry C, Daniel J, Hajo G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Clin Microb, 2004, 42: 5644-5649.
- [11] P R 默里, C J 巴伦, M A 法勒, F C 特诺维, R H 约克. 临床微生物学手册[M]. 徐建国, 梁国栋, 邢来君, 范昕建, 冯正, 译. 北京: 科学出版社, 2005: 737-748.
- [12] 徐雄利, 陈双红, 陈锐勇, 武文斌, 巴剑波, 肖卫兵. 氮氧饱和潜水实验人群铜绿假单胞菌鉴定及毒力研究[J]. 中华疾病控制, 2012, 16: 25-27.
- [13] Maiden J, Bygraves J A, Edward F, Giovanna M, Joanne E R, Rachel U, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. PNAS, 1998, 95: 3140-3145.
- [14] Michael E H, Clay F, Matthew R P, Peterson S B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle[J]. Nat Rev, 2010, 8: 15-25.
- [15] Fredrik I R, Andy G, Pierre C, Angus B. Spite and virulence in the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* [J]. PNAS, 2009, 106: 5703-5707.
- [16] Thilo K, Angus B, Christian D. Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations[J]. PNAS, 2009, 106: 6339-6344.

[本文编辑] 尹茶