

广州市公共场所中央空调冷却塔水中军团菌 *mip* 基因分型

巩向丽^{1,2} 张颖¹ 屈平华³ 陈守义^{1*}

(1. 广州市疾病预防控制中心 广东 广州 510440)

(2. 中山大学 广东 广州 510080)

(3. 广东省中医院 广东 广州 510006)

摘要: 【目的】研究广州市公共场所中央空调冷却塔水中军团菌的基因特征和优势型别。【方法】采用军团菌巨噬细胞感染力增强因子(Macrophage infectivity potentiator, *mip*)基因分型方法。提取广州市 2008–2010 年分离的 140 株(119 株嗜肺, 21 株非嗜肺)军团菌基因组 DNA, 针对 *mip* 基因进行 PCR 扩增并测序, 将核苷酸序列上传至欧洲军团菌感染工作组(EWGLI)数据库进行比对, 得到 *mip* 型别, 并构建系统发育进化树。【结果】140 株军团菌均可扩增出 700 bp 左右的目的条带。119 株嗜肺军团菌分为 10 个 *mip* 型别, *L. pneumophila-phil-1* 为优势型别, 占 52.9% (63/119); 21 株非嗜肺军团菌分为 6 个 *mip* 型别, *L. feeleii*-D3131 为优势型别, 占 47.6% (10/21)。【结论】广州市公共场所中央空调冷却塔水中军团菌具有多样性, *mip* 分型技术可用于军团菌的快速基因分型。

关键词: 军团菌, 分子分型, *mip* 基因分型

Mip genotyping of *Legionella* isolated from central air-conditioning cooling towers in Guangzhou public places

GONG Xiang-Li^{1,2} ZHANG Ying¹ QU Ping-Hua³ CHEN Shou-Yi^{1*}

(1. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, Guangdong 510440, China)

(2. Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

(3. Guangdong Province Traditional Medical Hospital, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

基金项目: 广州市科技与信息化局科技攻关项目(No. 2010J-E391); 广州市医药卫生科技项目(No. 201102A213249)

*通讯作者: ✉: shouyi_chen@163.com

收稿日期: 2011-08-23; 接受日期: 2011-11-07

Abstract: [Objective] To analyze the genetic characteristics and dominant types of *Legionella* isolated from central air-conditioning cooling towers in public places in Guangzhou from 2008 to 2010. **[Methods]** Genomic DNA was extracted from 140 strains of *Legionella* (119 strains of pneumophila and 21 strains of non-pneumophila). Subsequently, the *mip* (macrophage infectivity potentiator) gene was PCR amplified, purified and sequenced. Those nucleotide sequences were blasted in the European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI) Database for the *mip* typing. Phylogenetic trees were constructed with the Neighbor-Joining (NJ) method using MEGA 5.0. **[Results]** Approximately 700 bp fragments of the *mip* gene was obtained from 140 *Legionella* strains. The 119 *L. pneumophila* were found to be in 10 *mip* types, with *L. pneumophila-phil-1* as the dominant accounting for 52.9% (63/119). The 21 non-*L. pneumophila* from the isolates were found to be in 6 *mip* types, with *L. feeleii-D3131* as the dominant accounting for 47.6% (10/21). **[Conclusion]** Great diversity was observed among *Legionella* strains in central air-conditioning cooling towers of Guangzhou public places, while the *mip* typing techniques used in this study could be used for fast genotyping of *Legionella*.

Keywords: *Legionella*, Molecular typing, *Mip* genotyping

军团菌(*Legionella*)是一种革兰氏阴性兼性细胞内寄生菌,广泛存在于天然淡水、人工水域和土壤环境中,是引起军团菌病(*Legionnaires disease*, LD)的病原菌。目前,已确认军团菌有 50 种,70 多个血清型,接近 20 种有临床分离报道^[1]。气溶胶是军团菌传播、传染的重要载体^[2]。近几年,国内军团菌的检出率呈上升趋势。广州市地处亚热带,气候温暖潮湿,较适于军团菌生长,尤其是夏秋季节,中央空调的使用频率和时间有所增加而又不注意清洗消毒,很容易造成军团菌的滋生,成为传播军团菌病的主要传染源^[3]。传统的血清学分型鉴定方法容易受环境因素的影响,且可能与其他菌种之间存在共同抗原而出现交叉凝集反应,以及由此发展而来的单克隆抗体分型同样存在稳定性差的缺陷^[1,4]。本研究采用 *mip* 基因分型方法^[5-6]对广州市公共场所中央空调冷却塔水中分离出的军团菌进行多态性研究,进一步了解本地区的优势菌群,为准确追踪突发军团菌病的来源以及军团菌病的预防、监测和流行病学调查提供依据,并为建立本地区军团菌分子型别库提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 选取 2008–2010 年广州市公共场所中央空调冷却塔水中分离并鉴定为军团菌的 140 株菌株,其中包括 119 株嗜肺军团菌和 21 株非嗜肺军团菌。

1.1.2 主要仪器和试剂: CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;基因扩增仪, GeneAmp PCR System 9700; 3130 型基因分析仪,美国 ABI 公司; DNA 电泳仪及凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

军团菌 CYE 琼脂及 BCYE 生长添加剂,英国 OXOID 公司;嗜肺军团菌血清群 1–14 型乳胶凝集试剂盒, PRO-LAB; PCR 系列试剂,大连宝生物工程有限公司; PCR 产物纯化试剂盒, QIAGEN 公司;测序相关试剂,美国 ABI 公司;引物由上海生物工程有限公司合成。

引物序列:

正向引物: 5'-GGG(A/G)ATT(A/C/G)TTTATG AAGATGA(A/G)A(C/T)TGG-3';

反向引物:

5'-TC(A/G)TT(A/T/C/G)GG(A/T/G)CC(A/T/G)

AT(A/T/C/G)GG(A/T/C/G)CC(A/T/G)CC-3';

测序引物: 5'-TTTATGAAGATGA(A/G)A
(C/T)TGGTC(A/G)CTGC-3'。

1.2 方法

1.2.1 血清学乳胶凝集试验: 菌株接种于 BCYE 培养基, 在 37 °C、2.5% CO₂ 环境下培养 72 h。挑取典型菌落进行血清学鉴定分型。

1.2.2 DNA 模板制备: 挑取适量 BCYE 平板上单克隆至 1 mL 灭菌双蒸水中, 振荡混匀, 100 °C 煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 13 000 r/min 离心 2 min, 取上清作为 PCR 反应的 DNA 模板。

1.2.3 PCR 扩增 *mip* 基因及产物纯化: 反应体系为 *Taq* 酶 1.25 U, 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP 混合物(dNTP 各 2.5 mmol/L) 4 μL, 正、反向引物各 1 μL (20 μmol/L), DNA 模板 1 μL, 加灭菌双蒸水至总体积为 50 μL。反应条件为: 96 °C 5 min; 94 °C 1 min, 58 °C 2 min, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保温。PCR 产物采用 QIAGEN 试剂盒纯化后经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后观察。

1.2.4 测序 PCR 及产物纯化: 反应体系为: 2.5×BigDye 4 μL, 5×BigDye Seq Buffer 2 μL, 测序引物 1 μL (3.2 μmol/L), 纯化的 PCR 产物 1 μL, 加灭菌双蒸水至总体积为 20 μL。反应条件为: 96 °C 1 min; 96 °C 10 s, 50 °C 5 s, 60 °C 4 min, 共 25 个循环; 4 °C 保温。测序 PCR 产物采用 NaAc/EDTA 法进行纯化。

1.2.5 测序: 测序 PCR 纯化产物经 10 μL Hi-Di 甲酰胺溶解后, 95 °C 4 min、4 °C 4 min 变性。在基因分析仪上样电泳。

1.3 数据分析

(1) 测序得到的 *mip* 基因序列上传至 EWGLI (European Working Group for Legionella Infections) 的 *mip* 基因序列数据库(<http://www.hpa->

bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip_id.cgi) 进行比对, 得出相应的型别。

(2) 分别将嗜肺军团菌中最主要的 *mip* 型别和 21 株非嗜肺军团菌的 *mip* 基因与 LBSN (List of Bacterial names with Standing in Nomenclature) 中军团菌标准菌株, ATCC 的 *mip* 基因应用 Clustal X2.0 软件进行序列比对, 应用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-Joining (NJ 法) 构建系统发育进化树^[7]。

2 结果

2.1 血清学分型

通过血清凝集试验将 119 株嗜肺军团菌分为 LP1、LP3、LP4、LP5、LP6、LP7、LP9 和 LP14 共 8 种血清型, 其中 LP1 型占 47.1% (56/119), LP14 型占 30.3% (36/119)。

2.2 *mip* 基因 PCR 扩增结果

图 1 为其中 18 株军团菌的 *mip* 基因电泳结果, 由图可见, 在 700 bp 左右均出现目的条带。

2.3 *mip* 基因序列与数据库比对结果

119 株嗜肺军团菌共分为 10 种 *mip* 型别, 分别为 *L. pneumophila-phil-1*、*L. pneumophila-sg3*、*L. pneumophila-sg4*、*L. pneumophila-sg5*、*L. pneumophila-sg7*、*L. pneumophila-sg10*、*L. pneumophila-Knox*、*L. pneumophila-Wads*、*L. pneumophila-97-2898* 和 *L. pneumophila-91-033*。10 种 *mip* 型别在 8 种血清型中的分布见表 1, 在广州市不同公共场所中央空调冷却塔水中的分布情况见表 2。

21 株非嗜肺军团菌分为 6 种 *mip* 型别, *L. feeleii-D3131*、*L. anisa*、*L. londiniensis*、*L. erythra-LC1317*、*L. longbeachae-sg1* 和 *L. busanensis*, 6 种型别在广州市不同公共场所中央空调冷却塔水中的分布见表 3。

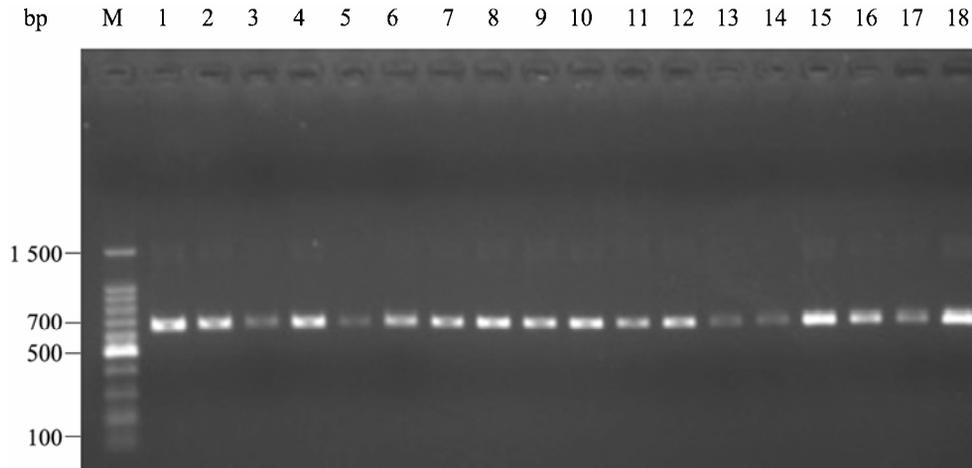


图 1 *mip* 基因 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of *mip* gene PCR product

注: M: 100 bp ladder; 1-15: 部分嗜肺军团菌 *mip* 基因扩增条带; 16、17、18: *L. feeleii*-D3131、*L. anisa* 和 *L. londiniensis* 的 *mip* 基因扩增条带.

Note: M: 100 bp ladder; 1-15: *mip* of some *L. pneumophila* isolates; 16, 17, 18: *mip* of *L. feeleii*-D3131, *L. anisa* and *L. londiniensis* respectively.

表 1 119 株嗜肺军团菌 10 种 *mip* 基因型在 8 种血清型中的分布(菌株数)

Table 1 The distribution of 10 *mip* genotypes in 8 serotypes of 119 *L. pneumophila* isolates, number of isolates

血清型 Serotypes	<i>mip</i> 基因型 <i>mip</i> genotypes										合计 Total
	<i>phil</i> -1	<i>sg</i> 3	<i>sg</i> 4	<i>sg</i> 5	<i>sg</i> 7	<i>sg</i> 10	<i>Knox</i>	<i>Wads</i>	97-2898	91-033	
LP1	38	6	3	1	0	0	5	3	0	0	56
LP3	0	4	0	0	0	0	0	1	0	0	5
LP4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	4
LP5	0	0	0	0	1	4	0	1	1	0	7
LP6	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	4
LP7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
LP9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
LP14	19	6	0	1	0	7	1	0	0	2	36
Total	63	16	7	2	2	14	6	6	1	2	119

表 2 119 株嗜肺军团菌 10 种 *mip* 基因型在广州市不同公共场所的分布(菌株数)

Table 2 The distribution of 10 *mip* genotypes of 119 *L. pneumophila* isolates in different public places of Guangzhou, number of isolates

公共场所 Public places	<i>mip</i> 基因型 <i>mip</i> genotypes										合计 Total
	<i>phil</i> -1	<i>sg</i> 3	<i>sg</i> 4	<i>sg</i> 5	<i>sg</i> 7	<i>sg</i> 10	<i>Knox</i>	<i>Wads</i>	97-2898	91-033	
地铁站 Subway stations	35	15	5	2	1	4	5	0	0	0	67
宾馆、酒店 Hotels	11	1	0	0	0	4	0	6	0	0	22
写字楼 Office building	14	0	2	0	0	3	1	0	1	0	21
展馆 Expocenter	3	0	0	0	1	3	0	0	0	2	9
合计 Total	63	16	7	2	2	14	6	6	1	2	119

表 3 21 株非嗜肺军团菌 6 种 *mip* 基因型在广州市不同公共场所中的分布(菌株数)
Table 3 The distribution of 6 *mip* genotypes of 21 non-*L. pneumophila* isolates in different public places of Guangzhou, number of isolates

公共场所 Public places	<i>mip</i> 基因型 <i>mip</i> genotypes						合计 Total
	<i>feeleii</i> -D3131	<i>anisa</i>	<i>londiniensis</i>	<i>erythra</i> -LC1317	<i>Longbeachae</i> -sg1	<i>Busanensis</i>	
地铁站 Subway stations	10	1	1	0	0	0	12
宾馆、酒店 Hotels	0	0	2	2	0	0	4
写字楼 Office building	0	1	0	0	1	0	2
展馆 Expo center	0	2	0	0	0	1	3
合计 Total	10	4	3	2	1	1	21

2.4 系统发育进化树

2.4.1 用 NJ 法对 63 株 *phil-1* 型嗜肺军团菌的 *mip* 基因构建系统发育进化树(图 2): 63 株 *phil-1* 型嗜肺军团菌中, 38 株为 LP1 血清型, 19 株为 LP14 血清型, 6 株为 LP7 血清型。其中 35 株来自地铁站, 11 株来自宾馆、酒店, 14 株来自写字楼, 3 株来自展馆。除 2010 年自地铁站冷却塔水中分离出的嗜肺血清 1 型军团菌 strain29 外, 其余 62 株 *phil-1* 型嗜肺军团菌均处于同一分支下, 表明亲缘关系较近, 而 strain29 与它们亲缘关系较远, 可能来源于不同的祖先。

2.4.2 用 NJ 法对 21 株非嗜肺军团菌的 *mip* 基因构建系统发育进化树(图 3): 21 株非嗜肺军团菌中, strain11、13、19、20 来自宾馆、酒店, strain16、17 来自写字楼, strain 9、10、18 来自展馆, 其余 12 株均来自地铁站。21 株非嗜肺军团菌的 6 个 *mip* 型别与其各自相对应的标准菌株均处于同一分支下, 表明亲缘关系较近。系统进化树的结果与 *mip* 基因序列上传至 EWGLI 比对的结果高度一致。

3 讨论

随着时代的发展和社会的进步, 中央空调已广泛应用于地铁、商场、宾馆、企业办公楼等各种公共场所, 它给人们生活带来舒适的同时, “空调病”作为一种现代病也对人们的健康构成威胁。

世界各地已报道了多起军团菌病的暴发和流行。我国 1982 年在南京发现首例军团菌病病例, 1985–2005 年, 国内正式报道 13 起不同规模的流行, 其中 10 起由嗜肺军团菌引起, 1 起由米克戴德军团菌引起, 1 起由博杰曼军团菌引起, 1 起未进行鉴定^[8]。目前对军团菌进行分子分型已成为流行病学溯源和调查的重要手段。

mip 基因编码表达于军团菌表面的巨噬细胞感染力增强子蛋白, 对军团菌进入阿米巴和巨噬细胞有促进作用^[9]。*mip* 基因能稳定遗传, 一般不会发生同源重组, 且变异程度明显高于 16S rRNA, 相比之下更适用于不同军团菌种之间的鉴别^[5,10]。本实验采用特异性引物对 140 株军团菌 *mip* 基因进行 PCR 扩增, 均能扩出 700 bp 左右的目的条带(图 1)。119 株嗜肺军团菌分为 8 个血清型, 以 LP1 型为优势型别, 占 47.1% (56/119), 其次是 LP14 型, 占 30.3% (36/119) 和 10 个 *mip* 型, 以 *L. pneumophila-phil-1* 为优势型别, 占 52.9% (63/119), 其次是 *L. pneumophila-sg3* 和 *L. pneumophila-sg10*, 各占 13.4% (16/119)。由表 1 可知, *mip* 基因分型可以将血清型相同的菌株又分为不同的型别, 如把 56 株嗜肺血清 1 型军团菌又分为 6 个不同的 *mip* 型, 表明该分型方法可以进一步掌握菌株的基因型别, 为军团菌病的分子流行病学调查提供依据。在 4 类公共场所中, 地铁站、宾

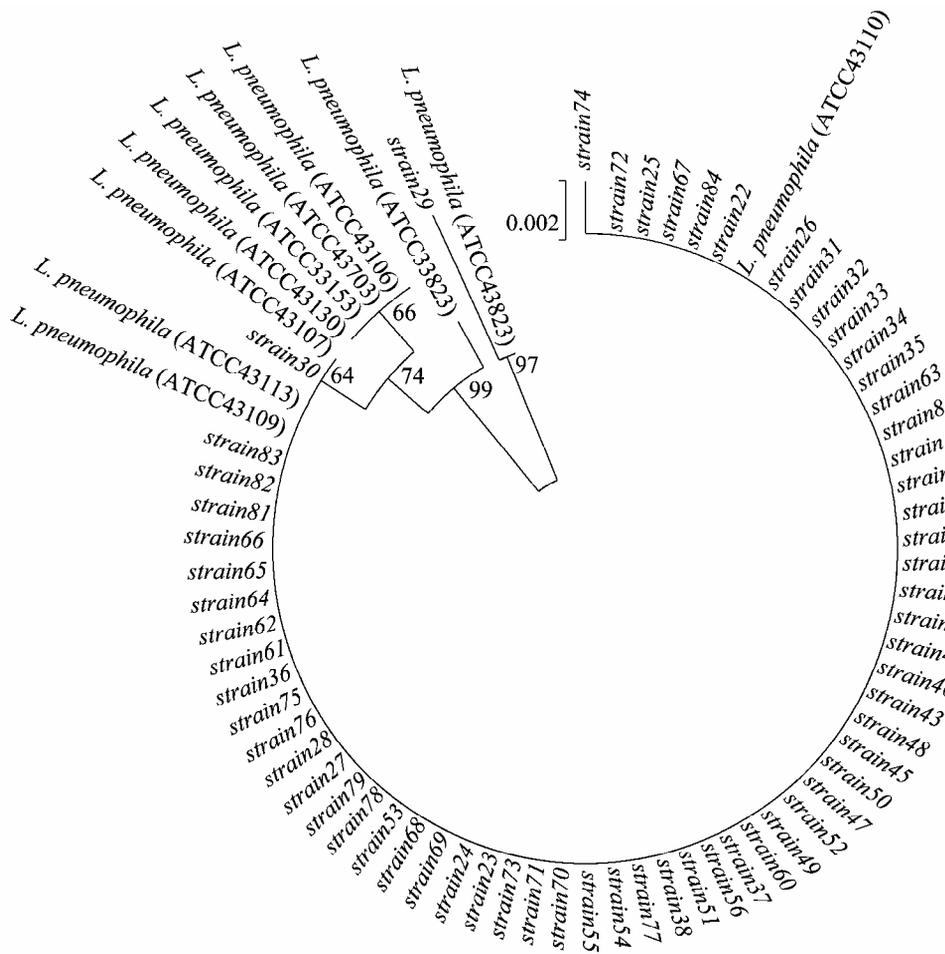


图 2 63 株 *phil-1* 型嗜肺军团菌的 *mip* 基因系统发育进化树
 Fig. 2 *mip* phylogenetic tree of 63 *Legionella pneumophila-phil-1* isolates

馆酒店和写字楼冷却塔水中分离的嗜肺菌株均以 *L. pneumophila-phil-1* 型占优势, 但展馆的优势型别不明显。另外地铁站冷却塔水中分离的嗜肺军团菌具有较明显多样性, 共有 7 个 *mip* 型(表 2)。结合采样资料显示, 同一时间同一地点冷却塔水中可有几种不同的 *mip* 型别(包含嗜肺与非嗜肺)同时共存的现象, 一种 *mip* 型别也可在不同时间不同地点冷却塔水中分布, 如 *L. pneumophila-phil-1* 和 *L. pneumophila-sg10* 型分布较为广泛, 在 4 类公共场所冷却塔水中均有检出。

21 株非嗜肺军团菌共分为 6 个 *mip* 型, 以 *L. feeleii-D3131* 为优势型别, 占 47.6% (10/21), 且均

从地铁站中央空调冷却塔水中分离所得, 另外地铁站还分离出 *L. anisa* 和 *L. londiniensis* 型各一株。

虽然嗜肺军团菌与人类关系最为密切, 但非嗜肺军团菌的致病性也不容忽视, 目前关于非嗜肺军团菌分型的相关文献较少, 本实验对 2008–2010 年广州市公共场所中央空调冷却塔水中分离出的 21 株非嗜肺军团菌进行 *mip* 分型, 为非嗜肺军团菌引起的军团菌病的流行病学调查提供依据。

通过本实验对广州市公共场所中央空调冷却塔水中军团菌的基因特征以及优势型别和分布情况有了进一步了解。*mip* 基因分型技术操作简

单、快速,且 EWGLI 已建立了相对全面的用于 *mip* 基因序列比对的免费网络数据库,有利于不同来源军团菌的比较,对军团菌病暴发流行时快速追溯传染来源和调查传播途径具有重要意义。

但由于该方法只针对 *mip* 单基因进行分型,不能覆盖军团菌的整个染色体,所以分型能力有一定的局限性,为进一步明确不同来源菌株之间的遗传相关性可与其他分子分型方法相结合。

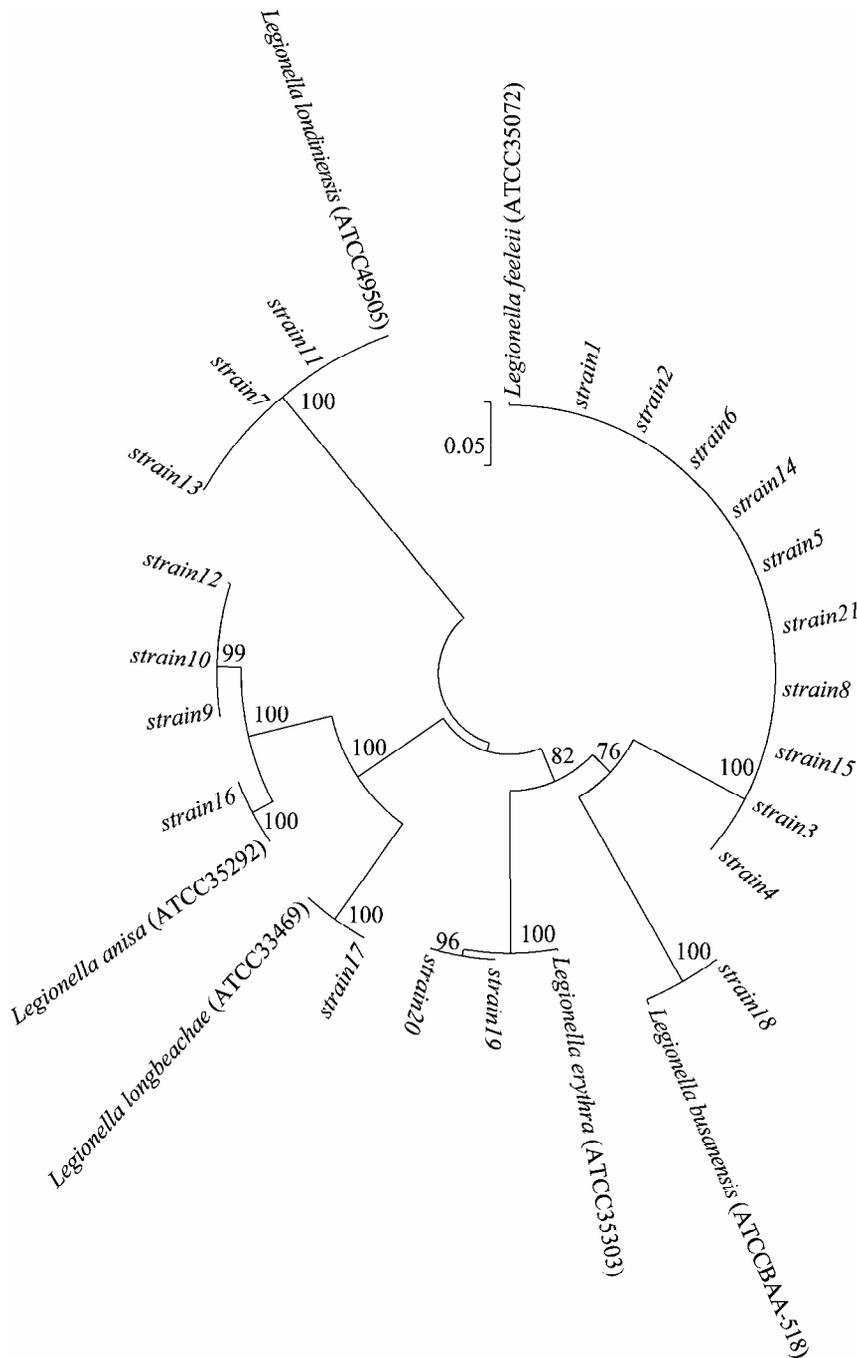


图 3 21 株非嗜肺军团菌的 *mip* 基因系统发育进化树

Fig. 3 *mip* phylogenetic tree of 21 non-*Legionella pneumophila* isolates

参 考 文 献

- [1] 胡朝晖, 屈平华, 刘元力, 等. 广东地区嗜肺军团菌的扩增片段长度多态性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1659-1665.
- [2] Fry NK, Bangsberg JM, Bernander S, et al. Assessment of intercentre reproducibility and epidemiological concordance of *Legionella pneumophila* serogroup 1 genotyping by amplified fragment length polymorphism analysis[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2000, 19(10): 773-780.
- [3] 朱庆义, 胡朝晖, 梁耀铭, 等. 广东地区环境水源和临床标本嗜肺军团菌培养与基因快速鉴定[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(1): 19-22.
- [4] Bernander S, Jacobson K, Helbig JH, et al. A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2503-2508.
- [5] Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, et al. Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the *mip* gene[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(6): 1560-1567.
- [6] Fry NK, Afshar B, Bellamy W, et al. Identification of *Legionella* spp. by 19 European reference laboratories: results of the European Working Group for Legionella Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools[J]. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2007, 13(11): 1119-1124.
- [7] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [8] 路凤, 金银龙, 程义斌. 军团菌病的流行概况[J]. 国外医学卫生学分册, 2008, 35(2): 78-83.
- [9] 宣瑞红, 胡朝晖, 朱庆义. 军团菌分子生物学分型测定及其实用性研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2010, 11(1): 103-106.
- [10] Støhlhaug A, Bergh K. Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by *mip* sequencing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 6394-6398.

稿件书写规范

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前3个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Hind* III、*Sau*3A I等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。