

2012—2015年贵州省炭疽芽胞杆菌分离鉴定及MLVA分型分析

马青¹,喻欢²,刘英¹,王铭¹,姚光海¹,唐光鹏¹,王定明¹,李世军¹

摘要:目的 了解菌株的分子流行病学特征,为贵州省炭疽疫情的预防控制提供科学依据。**方法** 对2012—2015年贵州省间不同地区的409份标本(外环境388份、患者19份和牲畜2份)进行炭疽芽胞杆菌分离培养,采用革兰染色镜检、青霉素抑制试验和噬菌体裂解试验对可疑炭疽菌落进行鉴定,分析菌株检出情况。运用MLVA-15技术对炭疽芽胞杆菌分离株进行基因分型获得各VNTR位点的扩增长度并计算重复单元的重复数目。结合各VNTR位点重复数目,利用NTsys 2.10e软件对不同地区菌株进行聚类分析。**结果** 从409份标本中分离出34株炭疽芽胞杆菌,检出率为8.31%。其中341份土壤检出33株,检出率为9.68%;17份患者皮肤病灶渗出液检出1株,检出率为5.88%。2015年分离出炭疽杆菌的阳性率最高,占48.72%(19/39)。MLVA-15分析显示,34株菌株被分为3个MLVA型;聚类分析显示,34株菌株被分为A和B两簇,其中A簇又被进一步分为A1和A2分支。来自相同地区或年份的多数菌株聚类关系相对较近。**结论** 2012—2015年贵州省间各种疑似炭疽送检标本中,土壤的检出阳性率最高,贵州省炭疽芽胞杆菌菌株具有MLVA型别多样性,型别分布和聚类关系具有明显的地域性。

关键词:炭疽;炭疽芽胞杆菌;MLVA-15;贵州

中图分类号:R378.7

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)07-0624-05

Identification and MLVA genotyping of *Bacillus anthracis* strains isolated in Guizhou Province from 2012 to 2015

MA Qing¹, YU Huan², LIU Ying¹, WANG Ming¹, YAO Guang-hai¹,
TANG Guang-peng¹, WANG Ding-ming¹, LI Shi-jun¹

(1. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China;
2. Zunyi Maternal and Child Care Service Center, Zunyi 563000, China)

Abstract: In order to provide scientific basis for the control and prevention of anthrax by the epidemiological characteristic of *Bacillus anthracis*. The 409 samples including 388 from outside environment, 19 from patients and 2 from animals in different regions of Guizhou Province from 2012 to 2015 were used for *B. anthracis* isolatation and identification by using the traditional Gram staining, penicillin inhibition experiments and bacteriophage lysis test. The *B. anthracis* genome DNA was amplified using PCR based on 15 variable number of tandem repeats (VNTR), respectively. The amplification length of each VNTR locus was obtained by capillary electrophoresis. The copy numbers of tandem repeat sequence were subsequently analyzed with the software of NTsys 2.10e. The results showed that 34 *B. anthracis* strains were isolated from 409 specimens with positive rate of 8.31%. The positive rates of soil and skin lesion exudate samples were 9.68% (33/341) and 5.88% (1/17), respectively. Among the four years, the year 2015 was with highest positive rate of *B. anthracis*, with positive rate of 48.72% (19/39). MLVA-15 genotyping showed that the 34 isolates were typed into 3 MLVA-15 types. Clustering analysis showed that the 34 isolates divided into A and B clusters. Clade A was further divided into A1 and A2 clade. Most isolates come from the same region or year was closely clustered. Results of this study suggested that the soil sample was of the highest positive rate with *B. anthracis* among all the samples from Guizhou Province during 2012—2015 and *B. anthracis* isolates in Guizhou Province were of genetic diversity and were clustered geographically.

贵州省科学技术基金项目(No.[2015]2084);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金项目(No.(2015)09);贵州省高层次创新型人才“百”层次培养项目(No.(2016)4021)

通讯作者:李世军,Email:zjumedjun@163.com

作者单位:1.贵州省疾病预防控制中心,贵阳 550004;

2.遵义市妇幼保健所,遵义 563000

Keywords: anthrax; *Bacillus anthracis*; MLVA-15;

Guizhou

Supported by the Natural Science Foundation of Guizhou Province (Grant No.[2015] 2084), the Special Funds for the Cultivation of Outstanding Youth Talents of Science and Technology in Guizhou Province (No.[2015] 09), the Special Funds for High-Level Creative Talents Cultivation Guizhou Province (2016)4021), and the Special Funds for Construction of Talent Base for Infectious Disease Control and Prevention (No.[2013]15)

Corresponding author: Li Shi-jun, Email: zjumedjun@163.com

由炭疽芽胞杆菌(以下简称炭疽杆菌)引起的炭疽病几乎遍及世界各地,四季均可发生^[1]。贵州省自1957年有炭疽疫情记载以来至七十年代,炭疽病例持续增加,范围不断扩大,经常有局部流行^[2]。近年来贵州省人间炭疽病时有发生^[3-4],病例虽然有所减少,但发病率仍远高于全国平均水平,例如2006年发病数高达117例。与此同时,贵州省畜间炭疽疫情也较为严重,给畜牧业造成了严重的损失^[5]。

炭疽杆菌形成芽胞以后可长期保存于土壤、草木和骨骼之中。可能由于这一特性减少其进化频率,使炭疽杆菌菌株具有很高的同源性。许多研究都证明,炭疽杆菌缺少分子的多样性,例如质粒电泳没有差异,基因组扩增片段长度多态性(AFLP)、核糖体RNA(rRNA)基因限制性片段长度多态性(RFLP)和保护性抗原(PA)的DNA序列差异都非常小^[6]。常用的脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型技术,随机扩增多态性DNA标记(RAPD)技术仅能区分炭疽芽胞杆菌同蜡样芽胞杆菌和枯草芽胞杆菌,即仅能鉴定到种间差异^[7-8],而多位点序列分型技术(MLST)对芽胞杆菌的研究证明炭疽杆菌具有单态性^[7,9]。1996年首次发现炭疽杆菌中存在串联重复序列,随后各国研究者对炭疽杆菌染色体和质粒DNA上的可变数目串联重复序列位点(VNTR)进行了研究,建立了能有效显示菌株多样性的多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)技术,并已应用于炭疽疫情和炭疽恐怖事件中传染源的追踪^[10]。本研究对2012—2015年贵州省疫情和监测点来源标本进行炭疽杆菌分离鉴定,采用世界公认的MLVA-15技术对分离菌株进行基因分型研究,阐明贵州省炭疽杆菌的MLVA型别分布、分子多样性和分子流行病学特征,为疫情的预警、突发公共卫生事件的应急处置、疫情的溯源等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 血琼脂平板和普通营养琼脂平板购自郑州贝瑞特公司,革兰染液购自北京陆桥技术有限责任公司,诊断用炭疽噬菌体购自兰州生物制

品研究所,青霉素纸片购自英国OXOID公司,Taqmix购自北京天一辉远公司,MLVA-15各位点引物由北京天一辉远公司合成。

1.2 标本来源 收集2012—2015年贵州省炭疽疫情发生地疑似炭疽感染的标本和监测点采集标本共409份,其中外环境标本388份(土壤341份、水47份)、患者标本19份(皮肤病灶渗出液17份、甲垢2份)和牲畜标本2份(马肉、猪肉各1份)。

1.3 细菌的分离培养和鉴定 按照《炭疽诊断标准》(WS283-2008)进行炭疽细菌学检查,挑取标本接种在血琼脂培养基上生长的疑似菌落进行革兰染色镜检、青霉素敏感实验和噬菌体裂解实验,同时用阳性菌株作阳性对照。

1.4 MLVA分型 将分离获得的炭疽杆菌菌株用煮沸法(挑取单菌落于0.2mL水中制成菌悬液,100℃加热10min,10000r/min离心10min,取上清液经0.22μm滤器过滤后备用)提取核酸后,采用参考文献[11]报道的引物序列和PCR方法扩增炭疽杆菌15个VNTR位点(vrrA、vrrB1、vrrB2、vr-rC1、vrrC2、CG3、pXO1-aat、pXO2-at、VNTR12、VNTR16、VNTR17、VNTR19、VNTR23、VNTR32、VNTR35)^[11]。PCR扩增反应体系(25μL)含Taqmix 12.5 μL,上下游引物(10 pmol /μL)各1 μL,DNA模板1 μL,去离子水9.5 μL。扩增参数为95℃预变性5 min;95℃30 s,60℃30 s,72℃1 min,34个循环;72℃延伸5 min。其中vrrB1、vrrB2位点退火温度为55℃,VNTR12、VNTR16、VNTR17、VNTR35位点退火温度为52℃,其余反应条件均相同。

1.5 MLVA聚类分析 扩增产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳,将得到单一一条带的PCR扩增产物委托北京天一辉远生物公司进行毛细管电泳分析获得菌株各位点的扩增长度,根据菌株各VNTR位点的序列长度、重复单元长度和两翼大小推算出各位点的重复数,再运用NTsys 2.10e软件非加权组平均法(UPGMA)根据各位点的重复数对菌株进行聚类分析,了解菌株的MLVA型别分布、分子多样性和分

子流行病学特征。

2 结 果

2.1 炭疽芽胞杆菌分离鉴定结果 经培养鉴定, 409 份标本共分离出 34 株炭疽芽胞杆菌可疑菌株, 菌株菌落形态特征呈扁平粗糙、不透明灰白色、无光泽、边缘不整齐、血平板上不溶血, 在低倍镜下菌落

呈卷发状, 经革兰氏染色后镜下呈竹节样革兰氏阳性杆菌, 青霉素抑制试验和噬菌体裂解试验均为阳性。各类标本中, 388 份外环境标本检出 33 株炭疽杆菌, 检出率为 8.51%; 19 份患者标本中检出 1 株炭疽杆菌, 检出率为 5.26%; 2 份牲畜标本中未检出炭疽杆菌; 各类样本检出结果见(表 1)。

表 1 2012—2015 年贵州省各类标本炭疽杆菌检出情况表

Tab.1 Detection results of *B. anthracis* strains from different type of samples in Guizhou from 2012 to 2015

年份	总标本数	总阳性数	外环境(标本数/阳性数)		患者(标本数/阳性数)		牲畜(标本数/阳性数)	
			土壤	水	皮肤渗出物	甲垢	肉	
2012	28	0	20/0	6/0	2/0	0/0	0/0	
2013	162	7	143/6	11/0	7/1	0/0	1/0	
2014	180	8	145/8	30/0	3/0	2/0	0/0	
2015	39	19	33/19	0/0	5/0	0/0	1/0	
合计	409	34	341/33	47/0	17/1	2/0	2/0	

2.2 炭疽芽胞杆菌 15 个 VNTR 位点重复数目分析结果 经 VNTR 位点 PCR 扩增和凝胶电泳检测, 对经凝胶电泳检测产生清晰条带的 34 株菌株各 VNTR 位点产物进行毛细管电泳分析, 结合序列长度、重复单元长度和两翼大小推算出各位点的重复数(表 2)。

2.3 炭疽芽胞杆菌 MLVA-15 聚类分析 按照 15 个 VNTR 位点重复数完全相同定义为一个 MLVA 基因型划分, 可将 34 株菌分为 3 个 MLVA 型(图 1)。聚类分析显示(图 1), 34 株菌株被分为 A 和 B 两簇, 其中 A 簇又可进一步分为 A1 和 A2 分支, 2014 年分离自织金县土壤的 2014008 菌株单独形成 A2 型。34 株菌中有 22 株菌属 A1 型, 占 64.71%。另外 11 株属 B 型, 占全部型别的 32.35%。来自瓮安、望谟的多数菌株聚类关系分别较近, MLVA 型别分布具有明显地域性。

3 讨 论

近年来, 贵州省每年均有炭疽病例报告, 病例虽然有所减少, 但发病率仍远高于全国平均水平。本研究对来自 2012—2015 年贵州省炭疽疫区的土壤、水样、人畜污物等 409 份标本进行炭疽芽胞杆菌分离鉴定。结果显示, 共分离出 34 株炭疽杆菌菌株, 检出阳性率高达 8.31%, 低于 2006—2011 年从 830 份标本中分离出 88 株炭疽杆菌的检出率 10.60%^[12]。此外, 19 份皮肤炭疽患者标本中仅 1

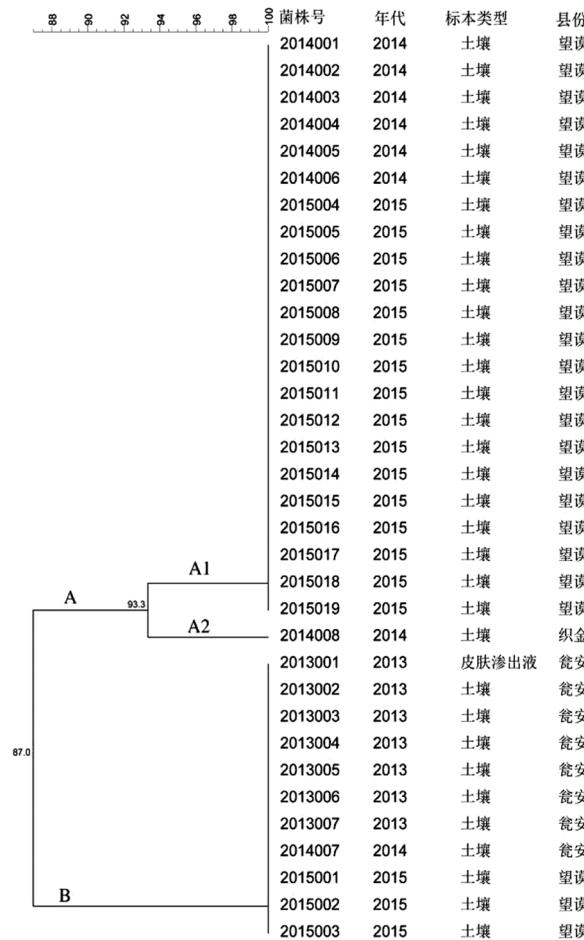


图 1 2012—2015 年贵州省炭疽菌株 MLVA 聚类分析

Fig.1 Cluster analysis of MLVA for *B. anthracis* from 2012 to 2015 in Guizhou

表2 2012—2015年贵州省炭疽芽孢杆菌分离株15个VNTR位点序列长度及重复数
Tab.2 Sequence length and repeat number for 15 VNTRs of *B. anthracis* isolated in Guizhou Province from 2012 to 2015

菌株号	vrrA	vrrB1	vrrB2	vrrC1	vrrC2	CG3	pXO1-aat	pXO2-at	VNTR12	VNTR16	VNTR17	VNTR19	VNTR23	VNTR32	VNTR35	
	长度	重复数	长度	重复数	长度	重复数	长度	重复数	长度	重复数	长度	重复数	长度	重复数	长度	重复数
2013001	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	143	8
2013002	309	9	227	20	159	12	593	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2013003	308	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2013004	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2013005	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2013006	308	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2013007	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2014001	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2014002	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2014003	309	9	227	20	159	12	591	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2014004	309	9	227	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2014005	308	9	227	20	159	12	593	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2014006	308	9	227	20	159	12	593	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2014007	308	9	226	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2014008	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015001	308	9	227	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2015002	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015003	308	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015004	308	9	227	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2015005	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015006	308	9	227	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2015007	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	138	8
2015008	309	9	227	20	159	12	591	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015009	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015010	309	9	227	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	139	8
2015011	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015012	308	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	138	8
2015013	308	9	227	20	159	12	591	53	530	16	156	2	129	8	138	8
2015014	308	9	227	20	159	12	592	53	529	16	156	2	129	8	138	8
2015015	309	9	227	20	159	12	591	53	530	16	156	2	129	8	138	8
2015016	309	9	227	20	159	12	593	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015017	308	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015018	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8
2015019	309	9	227	20	159	12	592	53	530	16	156	2	129	8	139	8

注:表中长度指该VNTR位点的核酸序列扩增长度,单位是“bp”

份标本检出炭疽杆菌,检出率为5.26%,其分离率低的原因可能与患者接受抗生素治疗或采样时间有关,因此,为能准确获得病原学依据,应尽可能在使用抗生素等药物治疗前采样进行病原学检测。本次检测的341份土壤标本分离33株炭疽杆菌,所分离菌株数占总菌株数的97.06%,提示疫源地外环境污染的严重性和暴发疫情的潜在危险,当地卫生与动物防疫部门应加强监测,并对环境进行消毒处理。此外,其余47份水样、2份病畜肉均未分离出炭疽杆菌,可能因未采集到被炭疽芽胞或菌体污染的水样或未能准确采集到病畜带菌部位所致。

2012—2015年检测出的34株炭疽杆菌来源于黔西南州、黔南州、毕节3个地区,其中以黔西南州居首位,其次为黔南州和毕节地区,检出菌株数分别为25、8和1株。黔西南州的望谟县检出25株,为检出菌株数最高的县,占73.53%。瓮安、织金县分别检出8株、1株炭疽杆菌,其中有2株菌株为采集消毒处理一年后的历史疫源地所分离,提示消毒处理不彻底,仍然存在发生炭疽疫情的风险。

MLVA技术因其能有效反映炭疽杆菌多态性的特点而被应用于炭疽杆菌的分型和疫情的分子流行病学调查研究^[13]。本研究基于15个VNTR位点的MLVA-15技术将2012—2015年贵州省分离的34株炭疽杆菌进行基因分型结果显示34株菌株被分为3个MLVA型别,反映了贵州省近年炭疽杆菌流行菌株的分子多样性。此外,聚类分析显示(图1)菌株2013001~2013007、2014007和2015001~2015003为同一MLVA型,被聚类为同一分支(B),2014001~2014006、2015004~2015019为同一MLVA型,被聚类在同一分支(A1),而分离自织金的2014008菌株独立为基因型A2分支。本研究中来自望谟县土壤样本共分离炭疽杆菌25株,除3株菌株2015001~2015003分离自油迈乡为基因型B外,其余菌株均属基因型A1。从地域或时间分布来看,34株菌株中多数来源于相同区(县)或年份的菌株之间聚类关系相对较近,菌株聚类关系具有明显地域和时间分布特点,提示不同地区的疫情由不同基因型别的菌株所致。

本研究中菌株2013001~2013007来源于2013年瓮安县同一起疫情标本分离所得,7株菌株均被划分为同一基因型B。值得注意的是,该起疫情解剖地土壤经消毒后2014年再次采取样本依然能分离出一株炭疽杆菌(菌株号2014007),与菌株2013001~2013007聚类最接近,同为基因型B,提

示疫情发生地仍然是炭疽杆菌的疫源地,应引起当地疫病防控相关部门重视。

炭疽历来是严重危害贵州省人兽健康的主要急性传染病之一,贵州省已被卫生部确定为重点炭疽监测省份。由于炭疽芽胞杆菌遗传信息的保守性,一般的分子分型方法难以将菌株的遗传特征进行有效鉴别,本研究我们采用15个VNTR位点的MLVA分型方法对贵州省近年炭疽杆菌进行基因分型,初步了解了贵州省2012—2015年间炭疽杆菌基因型别特征及其多样性,结果将为贵州省炭疽疫情发生时对传染源进行溯源、了解传播途径以及对炭疽防控措施的制定提供基础资料和科学依据。同时,本研究中所采用的MLVA-15技术也是贵州省首次引入该技术对炭疽杆菌进行病原学分析,为贵州省炭疽疫情防控提供了技术储备。

参考文献:

- [1] 何国庆,贾英民,丁立孝.食品微生物学[M].北京:中国农业大学出版社,2009:348-349.
- [2] 邹志霆,陶沁,何平.贵州省2000—2003年炭疽流行特征及暴发流行原因分析[J].医学动物防制,2005, 21(20):105-107.
- [3] 罗成波,孔令萍.贵州省黔西南州牲畜炭疽流行情况和防治对策[J].中国兽医杂志,2006, 42(8):36.
- [4] 张仕刚.皮肤炭疽标本分离炭疽杆菌两种方法比较[J].贵州医药,2010, 34(9):838-839.
- [5] 周忠英.羊炭疽病的诊断[J].贵州农业科学,2005, 33(1): 60-61.
- [6] 王秉翔,Smith KL,Keys C,等.中国的炭疽杆菌DNA分型及其地理分布[J].微生物学免疫学进展,2002,30(1):14-17.
- [7] 吴松羽.炭疽芽胞杆菌MLVA分子分型研究[D].南昌:南昌大学,2011.
- [8] Harrell LJ, Andersen GL, Wilson KH. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(7): 1847-1850.
- [9] Helgason E, Okstad OA, Caugant DA, et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(6): 2627-2630.
- [10] 田国忠.炭疽芽胞杆菌基因组中串联重复序列的研究[D].北京:中国疾病预防控制中心,2005.
- [11] Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, et al. Global genetic population structure of *Bacillus anthracis* [J]. PLoS One, 2007, 23;2(5): e461.
- [12] 马青,李世军,刘英,等.贵州省2006—2011年炭疽芽胞杆菌检出情况与致病性研究[J].中国人兽共患病学报,2014, 30(6): 632-635.DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.06.018
- [13] 周伟,郭学军.炭疽芽胞杆菌的基因分型[J].微生物学免疫学进展,2013, 41(4): 58-61.DOI: 10.13309/j.cnki.pmi.2013.04.001