

江西省致病性钩端螺旋体血清学和分子流行病学研究

张翠彩¹,徐建民²,邱海燕¹,张汀兰³,蒋秀高¹

摘要:目的 对2013年以来江西省致病性钩端螺旋体进行血清学、基因分型分析,以了解江西省钩端螺旋体血清学和分子流行病学特征。**方法** 对27株钩端螺旋体进行暗视野显微镜凝集试验确定血清群。PCR扩增16S rRNA基因、测序,确定基因种。利用MLST(multilocus sequence typing)研究进行基因分型分析,并应用BioNumerics(Version5.10)软件进行聚类分析。**结果** 血清群鉴定:27株菌株隶属于4个血清群,其中黄疸出血群为主要优势血清群,占59.26%,其次依次是爪哇群25.92%、澳洲群7.41%和巴达维亚群7.41%。基因种鉴定:27株菌株隶属于*L. interrogans*和*L. borgpetersenii*2个致病性基因种,*L. interrogans*为江西省主要优势型别,占77.78%。MLST研究显示27株菌株隶属于5个ST型别,其中ST1为主要基因型,占59.26%。BioNumerics软件分析:27株菌株分为5个Clusters对应于5个ST型,MLST基因型别具有明显的地域性特征,而年代间变化不明显。**结论** 黄疸出血群为江西省主要流行血清群,*L. interrogans*为主要致病基因种,ST1为主要基因型,充分了解江西省钩体病血清学和分子流行病学特征将对钩体病防控和疫苗制备有一定的指导意义。

关键词:钩端螺旋体;血清群;基因种;MLST

中图分类号:R377

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2018)12-1074-05

Molecular and serological characterization of pathogenic *Leptospira* in Jiangxi Province, China

ZHANG Cui-cai¹, XU Jian-min², QIU Hai-yan¹, ZHANG Ting-lan³, JIANG Xiu-gao¹

(1. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;
2. Jiangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330029, China;
3. Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: In order to explore the molecular and serological characterization of pathogenic *Leptospira* in Jiangxi Province, a collection of 27 strains isolated from Jiangxi Province in China since 2013 were analyzed using Serogroup identification, 16S rRNA gene sequencing and multilocus sequence typing (MLST) in this study. Seven loci were chosen for genotyping in MLST analysis and the results were analyzed by BioNumerics (Version 5.10) softwares. Microscopic agglutination test (MAT) was conducted and a total of four serogroups were identified among 27 *Leptospira* strains. Serogroup Icterohaemorrhagiae was the most frequent serogroup, accounting for 59.26%, followed by Javanica 25.92%, Australis 7.41% and Bataviae 7.41%, respectively. 16S rRNA sequencing was conducted and two pathogenic species of *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* were identified among the 27 isolates. *L. interrogans* was the most prevalence species, accounting for 77.78%, while the remaining 6 isolates were identified as pathogenic *L. borgpetersenii*. Five different sequence types (STs) were obtained By MLST. ST1 accounted for 59.26% and was the major genotype in Jiangxi Province in China. Phylogenetic analysis using BioNumerics softwares revealed that five major clusters (Cluster1 to Cluster5) corresponding to five ST types was identified among 27 isolates. Obvious epidemiological relationship was found between the distributions of STs and isolated location, but not across years. In this work, the results revealed that MLST analysis could be used to explore the genetic diversity and population structures of *Leptospira*. In this work, the results revealed that Serogroup Icterohaemorrhagiae was the most frequent serogroup,

国家科技重大专项(No.2017ZX10303405-002)和国家自然科学基金(No.81601812, No.81471968)联合资助(张翠彩、徐建民有同等贡献)

通讯作者:蒋秀高,Email:jiangxiugao@icdc.cn

作者单位:1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京

102206;

2. 江西省疾病预防控制中心,南昌 330029;

3. 西南大学,重庆 400715

L. interrogans was the most prevalence species, and ST1 was the major genotype in Jiangxi Province in China. The detailed serological and molecular characteristics circulating in this region may provide new insights into the epidemiology of leptospirosis and vaccine design in China.

Keywords: *Leptospira*; serogroup; species; multilocus sequence typing

Supported by the National Science and Technology Major Project on Infectious Disease Control and Prevention (No. 2017ZX10303405-002) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81601812 and 81471968) Zhang Cui-cai and Xu Jian-min contributed equally to this article.

Corresponding author: Jiang xiugao, Email: jiangxiugao@icdc.cn

钩端螺旋体病(简称钩体病)是由致病性钩端螺旋体(简称钩体)引起的人兽共患传染病,主要通过直接或间接接触感染动物的尿液而感染,主要宿主动物包括啮齿类动物(黑线姬鼠、黄毛鼠、黄胸鼠和褐家鼠等),以及家畜(猪、犬和牛等)。近年来以多位点序列分析(Multilocus sequence typing, MLST)为基础的分型方法,逐渐应用于细菌学基因分型、分子流行病研究。此外,细菌的16S rRNA具有高度的保守性已被广泛用于钩体菌基因种鉴定、分子进化的分析指标。江西省作为钩体病的老疫区,每年的钩体病发病率远高于全国平均发病率,而江西省的钩体病分子流行病学特征尚未见详细报道。本研究选取江西省2013年以来从宿主动物监测中分离到的27株钩体分离株,利用暗视野显微镜凝集试验进行血清群鉴定,利用16S rRNA基因测序技术对其进行基因种鉴定,以及利用MLST方法对其进行基因分型研究,初步探讨江西省致病性钩体的血清学、分子流行病学特征,为江西省钩体病预防控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 本研究共选用江西省2013年以来啮齿类动物监测中分离到的27株钩体分离株,分别来自上饶、上高、浮梁和上犹4个地区。

1.2 主要试剂 15群15型钩体参考菌株诊断血清由中国食品药品检定研究院提供;PCR Premix采用大连宝生物工程(大连)有限公司产品;100 bp DNA Marker采用北京天根生化科技有限公司产品;基因组提取采用北京赛百盛基因技术有限公司硅胶膜型TM基因组DNA提纯试剂盒。

1.3 血清群鉴定 采用暗视野显微镜凝集试验(Microscopic agglutination test, MAT),利用中国15群15型钩体参考菌株的免疫兔血清,对分离菌株进行血清凝集试验,利用暗视野显微镜观察,以出现50%菌体凝集菌群为最终鉴定血清群。

1.4 菌体DNA制备 钩体液态培养基在28℃培

养7~10 d,达到对数生长期提取基因组DNA,操作方法按试剂盒说明书进行。

1.5 16S rRNA基因PCR扩增、测序 参照参考文献[1]报道的引物序列进行PCR扩增、双向测序,引物序列如下:fD1: 5'-CCGAATTCTCGACAA-CAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3', rP2: 5'-CCC-GGGATCCAAGCTTACGGTACCTTGT-TACGACTT-3',引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。采用50 μL PCR反应体系扩增,Premix Ex Tag 25.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各2 μL,cDNA模板5 μL,纯水补充至50 μL反应体积。PCR扩增参数如下:95 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,扩增30个循环,最后72 °C延伸10 min。PCR产物纯化、双向测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.6 MLST七个位点PCR扩增、测序 参考文献报道MLST方案^[2],利用7个位点、*sucA*、*pfkB*、*tpiA*、*mreA*、*gluM*、*caIB*进行PCR扩增,各位点信息见表1,引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。采用20 μL反应体系进行扩增,Premix Ex Tag 10.0 μL,上下游引物(10 μmol/L)各1 μL,cDNA模板1 μL,纯水补充至20 μL反应体积。PCR扩增程序如下:95 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,扩增30个循环,最后72 °C延伸10 min。扩增产物纯化、双向测序,由宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.7 数据分析

1.7.1 基因种鉴定 将测序获得的16S rRNA基因序列与GenBank数据库进行同源性比对,以确定其基因种。

1.7.2 MLST研究 将7个位点序列与MLST网站<http://pubmlst.org/>上相应等位基因进行比较,获得每株菌等位基因谱(*gluM-pntA-sucA-tpiA-pfkB-mreA-caIB*)以及STs(Sequence Types)型别。利用BioNumerics软件进行聚类分析,观察菌株间的基因多态性及种群结构。

表 1 MLST 研究中 7 个位点信息
Tab.1 Seven loci in MLST analysis

位点	引物序列(5'-3')	PCR 产物大小/bp
<i>pntA</i>	F-TAGGAAARATGAAACCRGGAAAC R-AAGAACAGCAAGATCCACAAAYTAC	621
<i>sucA</i>	F-TCATTCCACTTYTAGATACCGAT R-TCTTTTTGAATTTTGACG	640
<i>pfkB</i>	F-CGGAGAGTTTATAARAAGGACAT R-AGAACACCCGCCGAAACAAAT	588
<i>tpiA</i>	F-TTGCAGGAACTGGAAAATGAAT R-GTTTACRGAACCHCCGTAGAGAAT	639
<i>mreA</i>	F-GGCTCGCTCTYGACGGAAA R-TCCRTAACTCATAAAAMGACAAAGG	719
<i>gluM</i>	F-AGGATAAGGTCGCTGTGGTA R-AGTTTTTCCGGAGTTCT	650
<i>caIB</i>	F-CAACTGCGGAYATAGGAGGAG R-ATTATGTTCCCCGTGAYTCG	650

2 结 果

2.1 血清群鉴定 经 MAT 试验结果显示:27 株江西省致病性钩体分离株隶属于 4 个血清群,分别是黄疸出血群、爪哇群、澳洲群和巴达维亚群。其中黄疸出血群为江西省主要优势血清群,占 59.26%(16/27),其次依次为爪哇群占 25.92%(7/27)、巴达维亚群占 7.41%(2/27)和澳洲群占 7.41%(2/27)。血清群分布存在一定程度的地域差异,浮梁和上饶地区以黄疸出血群为主,上犹地区以爪哇群为主,上高地区仅分离到一株菌株,为澳洲群,详见图 1。

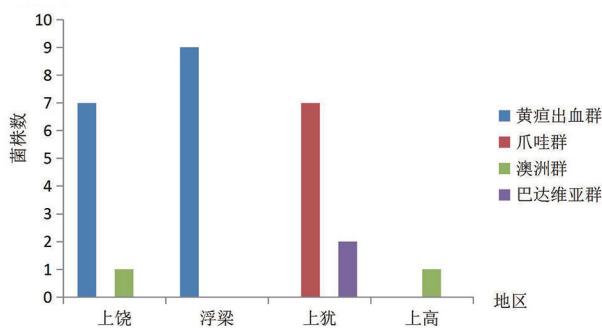


图 1 27 株江西省钩端螺旋体菌株不同地区血清群分布
Fig.1 Distribution of Serogroups among different regions for 27 *Leptospira* strains isolated from Jiangxi Province

2.2 基因种鉴定 27 株分离株的 16S rRNA 基因测序结果与 GenBank 数据库收录的钩体 16S rRNA 基因序列比对,同源性>99.7%认为是同一个基因种,结果显示:27 株菌株隶属于 *L. interrogans* 和

L. borgpetersenii 2 个致病性基因种,其中 *L. interrogans* 为江西省主要优势基因种,占 77.78%(21/27)。基因种分布存在一定的地域差异,例如 *L. borgpetersenii* 基因种仅存在于江西省上犹监测点,而 *L. interrogans* 基因种广泛存在于上饶、上高、浮梁和上犹 4 个监测点,详见图 2。

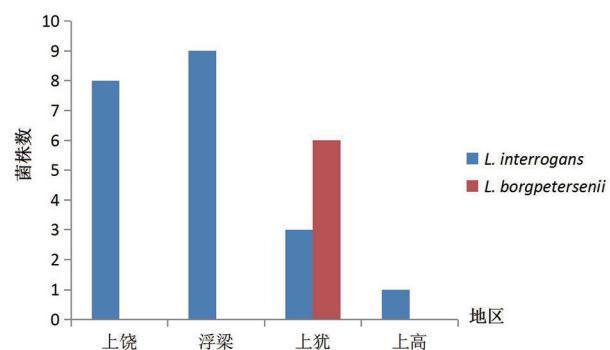


图 2 27 株江西省钩端螺旋体菌株不同地区基因种分布
Fig.2 Distribution of species among different regions for 27 *Leptospira* strains isolated from Jiangxi Province

2.3 MLST 基因多态性分析 MLST 研究结果显示,27 株致病性钩体呈现 5 个 ST 型别,其中 ST1 为主要优势 ST 型别,占 59.26%(16/27),其次依次为 ST143 占 22.22%(6/27)、ST105 占 7.41%(2/27)、ST224 占 7.41%(2/27)和 ST216 占 3.70%(1/27)。ST 分布也存在一定程度的地域差异,ST1 分布在浮梁和上饶地区,ST143 仅分布在上犹地区,ST105 分布在上饶和上高地区,ST216 和 ST224 仅在上犹地区分布,详见图 3。

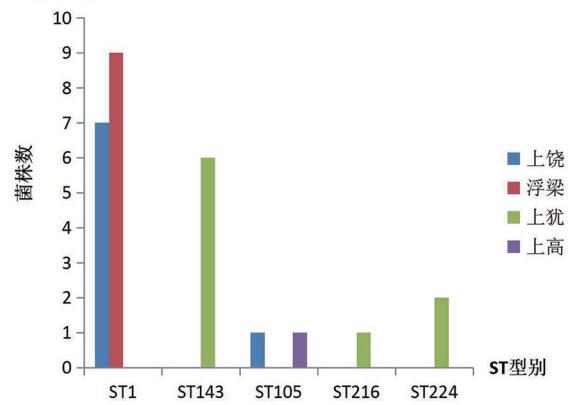
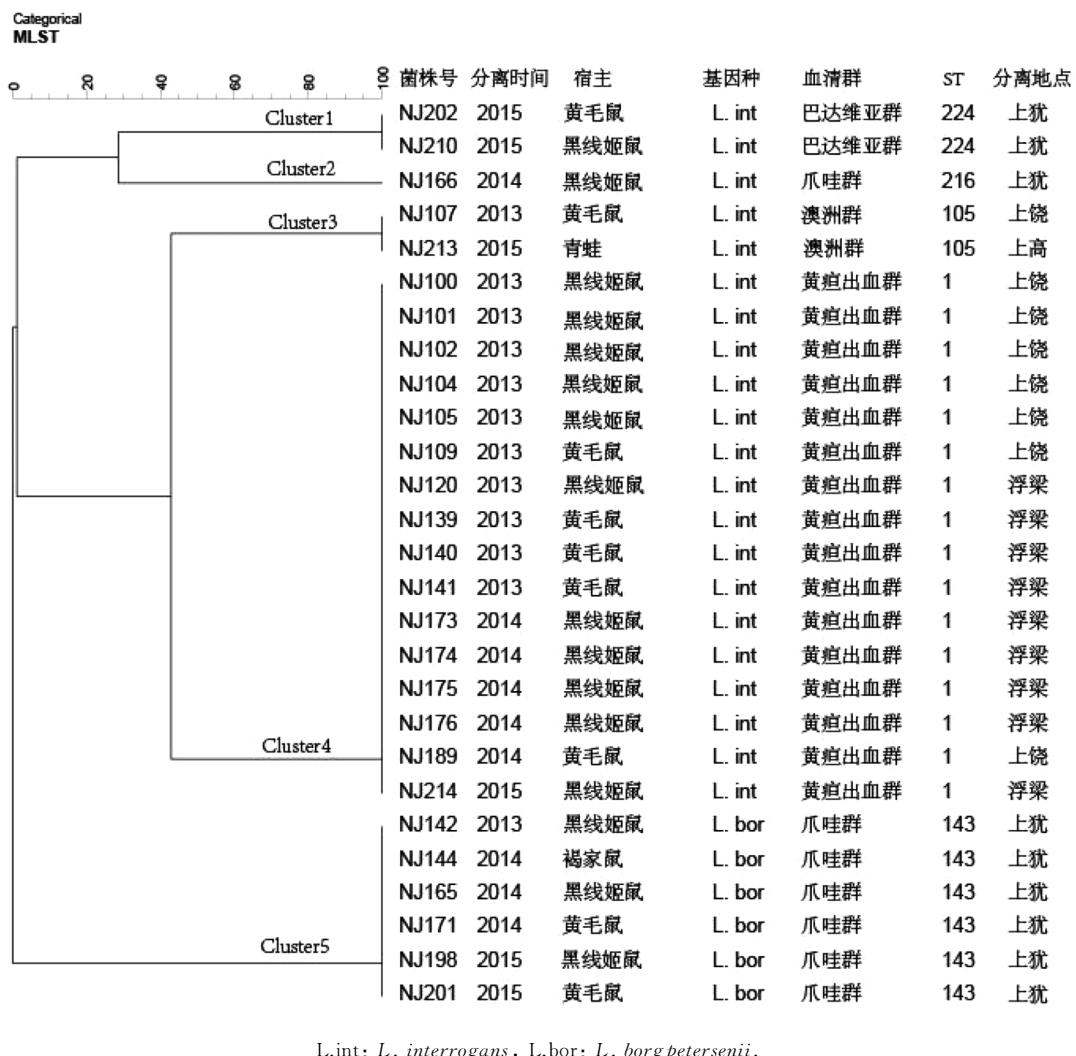


图 3 27 株江西省钩端螺旋体菌株 ST 型别在不同地区分布
Fig.3 Distribution of sequence types (STs) among different regions for 27 *Leptospira* strains isolated from Jiangxi Province

2.4 BioNumerics 软件分析 UPGMA 聚类分析显示:27 株菌株共分为 5 个 Cluster 群,分别对应 5 种 ST 型,详见图 4。Cluster1 对应 ST224,来自 2015 年上犹菌株;Cluster2 对应 ST216,为 2014 年上犹菌株;Cluster3 对应 ST105,来自 2013 年上饶和 2015 上高菌株;Cluster4 对应 ST1,为江西省的优势克隆群,包括 16 株 2013、2014 年上饶和 2013

—2015 年浮梁菌株;Cluster5 对应 ST143,来自 2013—2015 年上犹菌株。由聚类图显示:ST 和血清群构成在不同地域上均存在一定程度差异,而不同年代间差异不明显,ST 型别在宿主特异性方面也不明显。黑线姬鼠作为主要宿主,包括 ST224、ST216、ST1 和 ST143 四个 ST 型。



L.int: *L. interrogans*, L.bor: *L. borgpetersenii*.

图 4 27 株江西省钩端螺旋体 UPGMA 聚类分析

Fig.4 UPGMA dendrogram of 27 *Leptospira* strains isolated from Jiangxi Province

3 讨论

江西省是钩体病的老疫源地,该省每年均有数例钩体病上报病例,本研究黄疸出血群为江西省主要流行血清群,其次为爪哇群, *L. interrogans* 为主要致病性基因种, ST1 为主要优势 ST 型别,其次为 ST143。徐建民^[3]等 2010 年对 2002—2008 年的江西监测菌株进行 PFGE 研究发现:黄疸出血群赖型

是江西省人群及动物中优势血清型,本次研究中 2013 年以来江西主要流行型别在不同年代间变化不大。李世军等^[4-5]对 2007—2009 年分离自贵州的菌株进行研究发现:3 株分离株均隶属于 *L. interrogans* 基因种,黄疸出血群和 ST1 型别。王亚琳等^[6]报道 2010 年四川乐至县人群钩体疫情主要致病群血清群为黄疸出血群。综上所述,江西的主要流行株与中国四川、贵州等其他地区的主要流行菌

群、型别一致。

本研究发现江西地区钩体的基因种、血清群及ST型别分布存在地域差异。有文献报道 *L. interrogans* 基因种更适合在潮湿的环境生存,而 *L. borgpetersenii* 基因种在潮湿和干燥的环境均能生存^[7]。有实验数据表明:*L. interrogans* 适合在外环境例如外界表面水体中生存,可通过接触疫水传播钩体病,而 *L. borgpetersenii* 基因种不容易在外界环境生存,主要通过宿主动物间的直接传播^[8]。上犹处于江西的赣南山地地区,海拔在1 000~1 600 m 左右;而上饶、上高和浮梁处于赣北丘陵地区,海拔在100~300 m 左右,可能不同的海拔高度、地理位置、气候、宿主动物、环境等因素会影响钩体生存、传播,具体的致病、传播机制尚需进一步验证。

Thaipadungpanit 等^[9]对2000—2005年泰国东北部钩体疫情进行MLST分析,研究发现 *L. interrogans* 秋季群 ST34 为最主要的优势克隆群。Guernier 等^[10]对法国波利尼西亚塔希提地区的猪、鼠、人进行钩体检测,研究发现该地区存在 *L. interrogans* 和 *L. borgpetersenii* 2个基因种和3种ST型别,其中 *L. interrogans* 是主要致病基因种, *Leptospira interrogans* ST140 仅在猪中发现, *L. interrogans* ST17 和 *Leptospira borgpetersenii* ST149 在人和猪中均检测到。Voronina 等^[11]对俄罗斯29株钩体分离株进行分析,研究发现该地区存在 *L. interrogans*、*L. kirschneri* 和 *L. borgpetersenii* 三个基因种,其中 ST37、ST17、ST 199 (*L. interrogans*)、ST110 (*L. kirschneri*) 和 ST146 (*L. borgpetersenii*) 五个 ST 型别从时间和地域上在该地区普遍存在。Benacer 等^[12]对马来西亚半岛的城市鼠类进行钩体检测,研究发现:*L. interrogans* 为主要基因种,巴达维亚群和爪哇群为主要流行血清群, ST143 和 ST50 为主要流行 ST 型别。综合国内、国际钩体病文献报道发现,中国以及世界的常见致病基因种为 *L. interrogans* 和 *L. borgpetersenii* 基因种,以 *L. interrogans* 基因种为主,但是不同国家和地区又同时存在一些独特的 ST 型别,例如江西的主要流行型别 ST1 在其它国家尚未见报道。同时,中国江西钩体菌株基因多态性较高,优势 ST 型别 ST143 及优势血清型爪哇型与马来西亚半岛的钩体病流行型别相同,可能与同为东南亚国家,当地的地理位置、气候及环境因素相似有一定关系,具体的详细机制尚需进一步的实验验证。

本次江西钩体菌株的血清学、分子分型研究为江西省钩体病的分子流行病学研究提供了科学依据。

参 考 文 献:

- [1] Morey RE, Galloway RL, Bragg SL, et al. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(10): 3510-3516. DOI: 10.1128/JCM.00670-06
- [2] Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(1): e1954. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001954
- [3] 徐建民,蒋秀高,李秀文,等.江西省钩端螺旋体分离株脉冲场凝胶电泳分型和分析[J].中华流行病学杂志,2010,31(4):434-437.
- [4] 李世军,张翠彩,李秀文,等.贵州省3株钩端螺旋体分离株PF-GE分型与基因种鉴定[J].中国人兽共患病学报,2011,27(7): 587-591.
- [5] Li SJ, Zhang CC, Li XW, et al. Molecular typing of *Leptospira interrogans* strains isolated from *rattus tanzumi* in Guizhou Province, Southwest of China[J]. Biomed Environ Sci, 2012, 25(5):542-548. DOI: 10.3967/0895-3988.2012.05.007
- [6] Wang YL, Qin JH, Zhang CC, et al. An outbreak of leptospirosis in lezhi county, China in 2010 May possibly be linked to rainfall [J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(1): 56-59. DOI: 10.3967/bes2014.016
- [7] Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, et al. Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in southeast Asia[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(6):e2902. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002902
- [8] Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P, et al. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(39): 14560-14565. DOI: 10.1073/pnas.0603979103
- [9] Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, et al. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2007, 1(1): e56. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000056
- [10] Guernier V, Richard V, Nhan T, et al. *Leptospira* diversity in animals and humans in Tahiti, French Polynesia[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(6):e0005676. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005676
- [11] Voronina OL, Kunda MS, Aksanova EI, et al. The characteristics of ubiquitous and unique *Leptospira* strains from the collection of Russian centre for leptospirosis[J]. Biomed Res Int, 2014:649034. DOI: 10.1155/2014/649034
- [12] Benacer D1, Mohd Zain SN1, Ahmed AA, et al. Predominance of the ST143 and ST50 *Leptospira* clones in the urban rat populations of Peninsular Malaysia[J]. J Med Microbiol, 2016, 65(6):574-7. DOI: 10.1099/jmm.0.000262.