

• 综 述

细菌分子生物学分型技术研究进展*

龙 琴 综述, 刘靳波[△] 审校
(泸州医学院, 四川 泸州 646000)

关键词: 病原菌; 分子分型; 应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 10. 046

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)10-1423-03

细菌分型主要用于研究各菌株之间的克隆关系、确定感染源和感染途径、防止和控制病原菌的流行、预防交叉感染、明确致病力强的菌株和制定有效的控制措施等^[1]。传统的细菌分型方法依赖于细菌表型特征鉴定,如生化反应、血清学特点等,存在分辨率低、重复性差、操作繁琐、耗时费力等局限性^[2]。近年来,随着分子生物学的发展,基因分型技术已广泛应用于病原菌流行病学研究、医院感染控制、公共卫生防治等领域,采用的技术较多,包括质粒指纹图谱分析、脉冲场凝胶电泳技术、限制性内切酶技术等。选择合适的分型方法十分重要。本文就近年来常用的分子生物学分型方法的原理、优势、局限性、应用及研究进展等综述如下。

1 质粒指纹图谱分析

质粒指纹图谱分析根据质粒 DNA 电泳条带所构成的特征性图谱对细菌进行分型,包括质粒图谱分析和质粒限制性内切酶图谱分析,主要应用于细菌耐药基因流行传播的分析,常用于葡萄球菌属和肠杆菌属细菌^[3]。Shahkarami 等^[4]对 106 株金黄色葡萄球菌进行分析,发现 75 株携带不同数量的质粒,且与耐药表型无关。该方法优点是操作相对简单、耗时少、费用低,缺点在于质粒在某些因素作用下不稳定,可导致自发丢失、获得及转移^[5];其次,质粒图谱分析不能区分不含质粒的细菌,而质粒指纹图谱区分细菌流行株和非流行株的能力有限。

2 限制酶消化技术

脉冲场凝胶电泳(PFGE)和限制性酶切片长度多态性分析(PFLP)均利用不同的限制酶切割染色体 DNA,产生不同长度的酶切片段,通过电泳和 Southern 杂交技术将病原菌分型。现以 PFGE 为例进行简要介绍。

自 1984 年 Schwartz 等^[6]首次采用 PFGE 技术成功分离酿酒酵母染色体 DNA 以来,PFGE 以其重复性好、分辨力强而被认为是细菌分子分型的“金标准”。其基本原理是通过电场的不断改变,使包埋在凝胶中的 DNA 分子的泳动方向发生改变,小分子 DNA 比大分子 DNA 泳动快,呈现特异的电泳图谱,DNA 条带的密集度一定程度上反映了细菌基因组 DNA 浓度及 DNA 分子的大小,最终达到分型的目的。目前,PFGE 已成功应用于多种病原菌的流行病学研究。有研究对 30 株肠球菌进行分析,结果显示 PFGE 在分辨能力及重复性方面优于其他分型方法^[7]。然而,该方法耗时长、操作复杂,且电泳图谱分析易受操作人员技术水平的影响,给不同实验室间的比较带来一定困难^[8]。其次,PFGE 分析费用高,所需设备价格昂贵,

难以推广。再者,PFGE 检测结果显示的是病原菌电泳条带,而不是其 DNA 序列,在分析结果时必须根据其他流行病学资料或其他分子分型资料等进行合理的解释^[9-10]。此外,Davis 等^[9]研究发现其对大小相似的片段分辨力不高。另有研究发现 PFGE 不适宜用来分析有广泛基因重组现象的细菌^[11]。

3 基于聚合酶链反应(PCR)的分型技术

PCR 是一种广泛应用的 DNA 体外扩增合成技术。在 PCR 基础之上已衍生出多种用于细菌基因分型方法。

3.1 扩增片段长度多态性分析技术(AFLP) AFLP 最早应用于植物学方面的研究,现已普遍应用于细菌分型领域^[12]。该方法的基本原理是:基因组 DNA 用可产生粘性末端的限制性内切酶消化,产生大小不同的酶切片段,再与具有共同粘性末端的寡核苷酸双链接头连接成 DNA 模板,用与接头互补的带有选择性碱基的核苷酸序列为引物进行 PCR 扩增,再将扩增的酶切片段进行电泳,产生扩增片段长度不同的多态性带型,通过带型的差异对细菌进行分型和鉴定^[13]。该方法具有多态性丰富,不需要知道被测细菌的全基因组序列,不受环境影响,无复等位效应等优点。有研究利用 3 种方法对 110 株肠炎沙门菌进行分子分型,认为 AFLP 与 PFGE 分型能力相当,且更适于沙门菌地区性疫情调查^[14]。Donnarumma 等^[15]研究表明,AFLP 对鲍曼不动杆菌鉴定和分型的重复性高于 90%。此外,AFLP 是针对细菌全基因组的限制性酶切,在调查细菌流行病学和监控医院感染情况方面更权威^[16]。有研究利用 AFLP 对 1961~1993 年的 45 株霍乱弧菌进行分析,发现不同时期霍乱弧菌的流行病学特征及 1991 年非洲东南部和西部地区的流行疫源明显不同^[17]。但是 AFLP 已申请专利,试剂盒价格昂贵;同时,该方法所用引物取决于接头,对接头技术要求较高且操作繁琐。

3.2 随机引物扩增 DNA 多态性分析(RAPD) RAPD 基于较短的随机序列引物(通常为 10 bp),在低退火温度下与染色体 DNA 序列有较好的亲和力,通过扩增未知序列染色体 DNA 和比较扩增产物的多态性,在克隆水平上比较 DNA 的差异,从而对细菌进行分型鉴定。Trancassini 等^[18]用该方法将分离自囊性纤维化患者的 57 株木糖氧化无色杆菌分为 2 型。Sachse 等^[19]研究表明 RAPD 可作为肺炎克雷伯菌快速分型筛选方法。该技术无需预知待检细菌的基因组核苷酸序列,经济且简便易行,对样品 DNA 的质量要求不高,但是检测重复性易受退火温度、循环次数等因素的影响。

* 基金项目:四川省泸州市科技局科研项目(2013CDLZ-S15)。

作者简介:龙琴,女,主管检验师,主要从事临床微生物学检验研究。

[△] 通讯作者,E-mail:liujb7203@163.com。

3.3 重复序列 PCR(rep-PCR) rep-PCR 是通过扩增细菌基因组中广泛分布的短重复序列,即基因外重复回文序列(REP),获得菌株特异性图谱^[20]。Percin 等^[21]应用该方法将多粘菌素耐药鲍曼不动杆菌分为 3 个不同的克隆型,发现多粘菌素与万古霉素在体外存在协同作用。Gulbudak 等^[22]将 rep-PCR 成功应用于院内鲍曼不动杆菌流行病学研究。另有研究表明与其他 PCR 技术相比,rep-PCR 具有耗时短,所需 DNA 量小等优点^[23]。法国生物梅里埃公司近年来开发的 DiversiLab 系统亦基于 rep-PCR 原理。该系统可在 4 h 之内完成样品同源性自动化分析,还可以得到树状图、凝胶图像、矩阵图等报告,具有高效、快速、易操作等特点^[24]。但是,rep-PCR 的分辨力取决于待检菌株中存在的重复序列数目,且试剂、反应条件及凝胶电泳条件都可能影响实验结果^[25]。

4 DNA 测序技术

随着 DNA 测序技术的发展,细菌分子分型技术日益趋向于基于细菌 DNA 序列本身的差异。以下介绍 2 种发展较快的 DNA 测序技术。

4.1 多位点序列分型(MLST) MLST 是由 Maiden 等研究设计,最初用于研究自然变异的脑膜炎奈瑟球菌^[26]。该方法通过 PCR 扩增多个管家基因内部片段并进行序列分析,不同的细菌对应不同的序列型(ST),通过比较 ST 而对细菌进行分型。该技术可通过网络实现实验室间数据共享及比较,具有简便快捷、实验室间可比性强、可直接对临床标本进行分析等优点^[27]。Mezzatesta 等^[28]研究发现,PFGE 和 MLST 对鲍曼不动杆菌分型具有同样的分辨力和可重复性。Simmonds 等^[29]将该方法成功应用于社区百日咳杆菌分型。其缺点在于管家基因的变异决定了分辨力,且不适用于同血清型菌株间的比较。此外,该方法依赖基因测序,成本较高,影响其推广普及。

4.2 高通量测序技术 高通量测序技术又称“下一代”测序技术或深度测序,能同时对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定^[30]。该技术具有检测速度快,覆盖度广及产出巨大等特点^[31]。Snyder 等^[32]的研究表明,该技术对医院感染暴发流行的分析优势较大。但其局限性也不容忽视。首先,虽然测序速度较高,但错误率也相应较高^[33],对获得的大量数据进行处理和分析也难题之一。此外,该技术不适合小规模测序,且测序仪价格昂贵。

5 结 语

综上所述,不同的分型方法各有优劣。选择何种分型方法,不仅取决于方法的分辨能力、重复性、经济及劳动成本,还取决于实验室资源及实验者本身的操作技能和知识水平。

参考文献

[1] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-439.

[2] MacCannell D. Bacterial strain typing[J]. Clin Lab Med, 2013, 33(3): 629-650.

[3] Wang J, Stephan R, Karczmarczyk M, et al. Molecular characterization of bla ESBL-harboring conjugative plasmids identified in

multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans [J]. Front Microbiol, 2013, 4(3): 188-193.

[4] Shahkarami F, Rashki A, Rashki Ghalehnoo Z. Microbial susceptibility and plasmid profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. Aureus* [J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(7): 357-361.

[5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-439.

[6] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. Cell, 1984, 37(1): 67-75.

[7] Wijetunge DS, Dunn P. Fingerprinting of poultry isolates of *Enterococcus cecorum* using three molecular typing methods[J]. J Vet Diagn Invest, 2012, 24(6): 1166-1171.

[8] Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease[J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(7): 866-867.

[9] Davis MA, Hancock DD, Besser TE, et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Clin Microbiol, 2003, 41(5): 1843-1849.

[10] Mora A, Blanco M. Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8)[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(9): 4007-4015.

[11] Foucault C, La Scola B. Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella Quintana*[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 41-48.

[12] Gürtler V, Mayall BC. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(1): 3-16.

[13] 张东方, 袁飞, 陈颖, 等. 沙门菌分子分型方法研究进展[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(1): 117-120.

[14] Torpdahl M, Skov MN. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism[J]. J Microbiol Methods, 2005, 63(2): 173-184.

[15] Donnarumma F, Sergi S, Indorato C, et al. Molecular characterization of acinetobacter isolates collected in intensive care units of six hospitals in Florence, Italy, during a 3-year surveillance program: a population structure analysis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1297-1304.

[16] Kyle Petersen, Suzanne C, Cannegieter, et al. Diversity and Clinical Impact of *Acinetobacter baumannii* Colonization and Infection at a Military Medical Center[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 159-166.

[17] Lan R, Reeves PR. Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 172-181.

- [18] Trancassini M, Iebba V, Citera N, et al. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* in an Italian Cystic fibrosis center: genome variability, biofilm production, antibiotic resistance, and motility in isolated strains[J]. *Front Microbiol*, 2014, 5(2): 138-142.
- [19] Sachse S, Bresan S. Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 16(2): 125-129.
- [20] Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms[J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1661-1669.
- [21] Percin D, Akyol S, Kalin G. In vitro synergism of colistin with selected antibiotics against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *GMS Hyg Infect Control*, 2014, 9(2): 201-205.
- [22] Gulbudak H, Aslan G, Tezcan S, et al. Investigation of the clonal relationship between nosocomial *Acinetobacter baumannii* isolates by Rep-PCR[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2014, 48(2): 316-324.
- [23] Ranjbar R, Karami A. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide[J]. *New Microbiol*, 2014, 37(1): 1-15.
- [24] Wise MG, Healy M. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR[J]. *J Med Microbiol*, 2007, 56(6): 778-787.
- [25] Woo YK, Lee SH. Genetic diversity of multi-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from animals and humans[J]. *J Microbiol*, 2006, 44(1): 106-112.
- [26] Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [27] Bilhere E, Lucas PM, Claisse O, et al. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(5): 1291-1300.
- [28] Mezzatesta ML, D'Andrea MM, Migliavacca R, et al. Epidemiological characterization and distribution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(2): 160-166.
- [29] Simmonds K, Fathima S, Chui L, et al. Dominance of two genotypes of *Bordetella pertussis* during a period of increased pertussis activity in Alberta, Canada; January to August 2012[J]. *Int J Infect Dis*, 2014, 13(2): 223-225.
- [30] Sultan M, Schulz MH, Richard H, et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome[J]. *Science*, 2008, 321(5891): 956-960.
- [31] Steuernagel B, Taudien S, Gundlach H, et al. De novo 454 sequencing of barcoded BAC pools for comprehensive gene survey and genome analysis in the complex genome of barley[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(3): 547-551.
- [32] Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing[J]. *Euro Surveill*, 2013, 18(42): 1320-1325.
- [33] Chin FY, Leung HC, Yiu SM. Sequence assembly using next generation sequencing data: challenges and solutions[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 13(2): 135-139.

(收稿日期: 2015-01-02)

• 综 述 •

自身抗体临床应用及实验诊断研究进展

彭 玲 综述, 王开正 审校
(泸州医学院, 四川 泸州 646000)

关键词: 自身抗体; 自身免疫性疾病; 实验诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 10. 047

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)10-1425-04

自身免疫性疾病(AID)是一组以机体免疫系统攻击自身一种或多种成分,从而导致器官和组织损伤或功能障碍为特征的疾病。该病是以遗传因素为发病基础,多种环境因素包括吸烟、食品、化妆品、细菌、病毒、紫外线等为诱发因素的复杂疾病^[1]。自身抗体(AAB)是自身免疫应答和 AID 的重要特征,自身抗体对于 AID 的诊断及鉴别诊断、疾病活动度判断、病情评估、疗效观察和指导用药都具有重大价值,多种自身抗体已被纳入到相关 AID 的诊断指南中。随着蛋白纯化技术的发展,新的特异性靶抗原及相应自身抗体不断被发现,越来越多的疾病被归入到 AID 范畴。自身抗体实验诊断技术持续发展,多种商品化试剂已被广泛用于临床,检测方法也从传统的纯手工定性向高通量、自动化、定量检测发展。自身抗体应用及实验诊断水平在最近二十年取得了阶段性进展,同时也存在

一些问题。本文就以上问题综述如下。

1 自身抗体在一般人群中的分布特点及意义

对于自身抗体的产生机制目前尚不十分明确,但普遍认为与机体免疫耐受机制出现异常密切相关,自身反应性淋巴细胞的异常激活,产生针对正常组织具有破坏作用的自身抗体。自身抗体是 AID 重要特征之一,也是临床诊断 AID 的重要依据。但事实上自身抗体在一般人群中的阳性率却远超过了 AID 的发病率。研究发现,约有 25% 的个体存在至少为低滴度(即间接免疫荧光法滴度大于或等于 1:40)的自身抗体阳性,约 5% 的健康人存在大于或等于 1:160 的 ANA 阳性。用敏感的检测技术,几乎所有甲状腺功能正常者均能检测出正常参考范围低限的抗甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb)^[2]。除此之外,在感染、组织损伤、慢性肝病、肺纤维化、肿瘤等非 AID 患病人群