

Leptospira alstoni 致病性钩端螺旋体的 多位点序列分析研究

徐颖华,李喆,杜宗利,辛晓芳,叶强

中国食品药品检定研究院 卫生部生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室,北京 102629

摘要: **目的** 探讨分析 *Leptospira alstoni* 致病性钩端螺旋体的基因型。**方法** 应用多位点序列分析 (multilocus sequence typing, MLST) 技术研究仅在我国分离发现的三株 *Leptospira alstoni* 致病性钩端螺旋体的基因型,并与 MLST 数据库收录的当前中国流行血清群进行聚类分析。**结果** 成功将三株菌株 7 个管家基因扩增出来,基因测序结果通过与 MLST 数据库比对,发现这三株菌株 MLST 结果并不能匹配数据库中已有 MLST 基因型,表明这三株菌株具有三种不同的 MLST 基因型。聚类分析结果显示这三株致病性钩端螺旋体形成一个独立的进化分析,与当前在中国流行的七种致病性钩端螺旋体血清群明显不同。**结论** 发现三种不同致病性钩端螺旋体 MLST 基因型,这些结果为未来致病性钩端螺旋体分子分型、溯源奠定一定理论基础。

关键词: 钩端螺旋体; 多位点序列分析; 基因型; 血清群

中图分类号: R514.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2020)07-0879-02 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.07.032

钩端螺旋体病是由致病性钩端螺旋体 (简称钩体) 引起的一种急性人兽共患传染病^[1]。其动物宿主的种类繁多,人感染钩体病主要因为直接或间接接触了带菌动物的尿液、受污染的水或土壤,钩体病的表现轻重不一,轻微的呈流感样症状,严重的出现黄疸、肺出血、肝肾等多器官衰竭的致病性感染,其病死率在一些地区甚至高达 25%^[2-3]。由于钩体病多呈散发流行,且人们缺乏对本病的认识和警惕,导致常忽视其存在,大大低估了钩体病实际的发病率。因此加强钩体病原体的监控就显得尤为重要^[2,4]。应用 16s RNA 分析方法可以将致病性钩体分为问号、波氏和 *Leptospira alstoni* 等 9 个基因种,其中前两个基因种为最主要流行菌株,而 *Leptospira alstoni* 基因种流行菌株当前仅在中国分离发现^[5-6]。以前的多位点序列分析 (multilocus sequence typing, MLST) 研究也主要集中这两个主要流行基因种菌株^[7-8]。本研究应用 MLST 对收集保存三株 *Leptospira alstoni* 致病性钩体基因种菌株进行基因分型分析,并由此探讨其种群结构和亲缘进化关系。

1 材料与方法

基金项目: 国家重大研发计划 (2018YFC1603900) 和国家自然科学基金项目 (81401249)

作者简介: 徐颖华,博士,研究员,主要从事细菌基因组学与疫苗质量控制研究工作。

通信作者: 叶强, E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn。

1.1 菌株 三株 *Leptospira alstoni* 基因种致病性钩体: 澳洲血清群乳山型 (56 661) 菌株,于 1981 年在山东省的东方铃蟾中分离获得;拜伦群四川型 (56 668) 和蛙群平昌型 (56 667) 菌株,分别于 1979 和 1980 年在四川省的黑斑蛙中分离获得,当前这些菌种均保存在中国食品药品检定研究院的医学细菌保藏管理中心。

1.2 细菌培养和 DNA 提取 将钩体菌株接种至含 10% 兔血清的磷酸盐培养基中,放置培养箱 28 ℃ 培养 10~14 d,10 000 g 离心 20 min,收集菌体,按照试剂盒推荐操作步骤提取细菌全基因组 DNA,-20 ℃ 保存备用。

1.3 MLST 分析 参照文献^[7]的方法,以提取钩体菌株 DNA 为模板,并应用文献推荐的 7 种管家基因引物 (表 1) 进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析证实后送测序。将测得的钩体 7 个管家基因序列结果与钩体 MLST 数据库网站 (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_leptospira_seqdef&page=sequenceQuery) 上相应的管家基因进行比对,获得相应等位基因号,最终确定各菌株的序列基因型。应用 Mega 软件,进行各株测序结果与 MLST 数据库中所包含的中国问号钩体基因种主要血清群的管家基因序列进行聚类进化分析。

表 1 MLST 所用引物序列及靶基因序列长度

基因位点	基因序列 (5'→3')	扩增产物大小 (bp)
glmU	上游引物: AGGATAAGGTCGCTGTGTA	650
	下游引物: AGTTTTTTTCCGGAGTTTCT	
pntA	上游引物: TAGGAAARATGAAACCRGGAAC	621
	下游引物: AAGAAGCAAGATCCACAAYTAC	
sucA	上游引物: TCATTCCACTTGTAGATACGAT	640

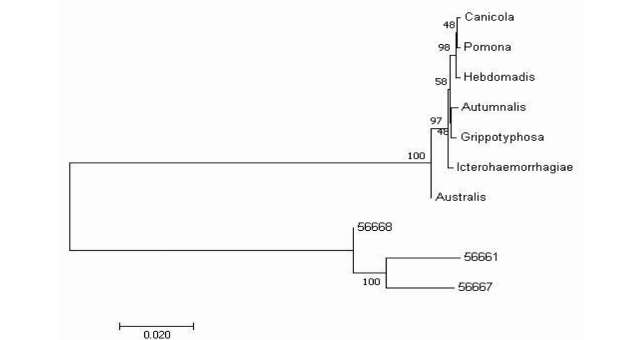
续表 1

基因位点	基因序列(5'→3')	扩增产物大小 (bp)
tpiA	下游引物:TCTTTTGTGATTTTTCAGC	639
	上游引物:TTGCAGGAAACGCGAAATGAAT	
pfb	下游引物:GTTTACRGAACCHCCCTAGAGAAT	588
	上游引物:CGGAGAGTTTATAARAAGGACAT	
mreA	下游引物:AGAACACCCGCGCAAAACAAT	719
	上游引物:GGCTGCTCTYACGCGAAA	
caiB	下游引物:TCRTAACTCATAAMGACAAAGG	650
	上游引物:CAACTGCGGAYATAGGAGGAG	
	下游引物:ATTATGTTCCCGTGATYCC	

2 结 果

2.1 三株致病性钩体 MLST 分析 应用 PCR 方法成功将三株菌株 7 个管家基因扩增出来,将扩增产物的测序结果与 MLST 数据库收录的相应管家基因进行比对分析,发现仅有 56 668 菌株中 3 个管家基因序列能与数据库匹配,即为 sucA1、tpiA2 和 mreA6 基因型,而该菌株其他 4 个管家基因以及 56 661 与 56 667 菌株的 7 个管家基因并不能匹配相对应等位基因型,例如,三株菌株的 glmU、pntA、pfb 和 caiB 基因序列分别与数据库中 glmU 46、pntA 62、pfb 63 和 caiB 33 型的相似度为 87%、86%、87%和 88%。而 56 661 与 56 667 菌株的 sucA 基因序列与 sucA57 基因型仅有 3 个碱基差异,相似度为 99%。该两株的 tpiA 和 mreA 基因序列与数据库中 tpiA12、50 基因型以及 mreA 28 和 2 基因型的相似度在 79%~83%之间。这些结果表明三株菌株的 MLST 基因型为 3 种不同新的 ST 型。

2.2 致病性钩体聚类分析 将上述已获得的 3 株 MLST 基因序列与 MLST 数据库已包含的中国主要血清群的管家基因序列进行聚类分析,发现两个不同的进化分支,三株 *Leptospira alstoni* 基因种致病性钩体形成一个独立的进化分析,与当前在中国流行的七种钩体血清群明显不同。尽管 56 661 菌株也为澳洲血清群,但其与数据库收录的问号钩体基因种的澳洲群菌株的进化距离较远,见图 1。



注:中国最主要流行钩体血清群主要包括 Canicola,犬群;Pomona,波摩那;Hebdomadis,七日热群;Autumnalis,秋季群;Grippotyphosa,流感伤寒群;Icterohaemorrhagiae,黄疸出血群;Australis,澳洲群。

图 1 致病性钩体 MLST 聚类分析

3 讨 论

由于钩体传统的血清学分类方法是采用暗视野显微凝集试验方法,操作繁琐、费时费力,且需要一系列的标准菌株或者标准血清^[9]。近些年,随着生物技术的发展。多位点序列分析由于方法简便快捷、仅需少量的 DNA,且结果数字化可在不同实验室间的对比分析等优点,逐渐被应用于病原体分子流行病学分析研究^[7-8]。本研究结果进一步证实 MLST 方法不仅可以用于问号和波氏钩体基因种流行菌株的基因分型研究,也可以用于 *Leptospira alstoni* 基因种流行菌株的分子流行病学分析。由于与当前 MLST 数据库种已收录的基因型不能完全匹配,建议三株菌株的 MLST 型为新的基因型,并已将相关材料递交给网站管理员,赋予其 ST 型编号。

由于与血清学分类、16r RNA 分析方法原理不同,基于 7 种管家基因序列 MLST 分析方法还可以研究分析菌株的亲缘关系^[7-8]。本研究的聚类分析结果证实尽管这三株 *Leptospira alstoni* 菌株来自不同地方和宿主,但其进化关系较近,推测相同的基因种钩体之间具有相似的进化历程。而相同的血清群,由于为不同基因种,其进化关系也不尽相同^[6]。这些研究结果为未来进一步监控致病性钩体奠定一定基础。

参考文献

[1] Picardeau M. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita[J]. Nat Rev Microbiol, 2017,15(5):297-307.

[2] Bertelloni F, Cilia G, Turchi B, et al. Epidemiology of leptospirosis in North-Central Italy: fifteen years of serological data (2002-2016) [J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2019, 65(1):14-22.

[3] Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010, 36 (Suppl 1):S5-7.

[4] 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.

[5] Xu Y, Zhu Y, Wang Ye, et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira* [J]. Sci Rep, 2016, 6:20020.

[6] Fouts DE, Matthias MA, Adhikarla H, et al. What makes a bacterial species pathogenic? Comparative genomic analysis of the genus *Leptospira* [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016,10(2):e0004403.

[7] Siriphan B, Janjira T, Premjit A, et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(1):e1954.

[8] Weiss S, Menezes A, Woods K, et al. An extended multilocus sequence typing (MLST) scheme for rapid direct typing of *Leptospira* from clinical samples [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(9):e0004996.

[9] Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2019,13(5):e0007270.