

单核细胞增生李斯特菌的现代分子生物学分型检测方法 & 研究进展^{*}

孔义华¹综述,焦彦朝²审校(1. 贵阳医学院第二附属医院检验科,贵州凯里 556000;
2. 贵州出入境检验检疫局,贵阳 550004)

【关键词】 单核细胞增生李斯特菌; 脉冲场凝胶电泳; 基因芯片技术; DNA 环介导恒温核酸扩增法; 基因测序技术

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 06. 053 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)06-0843-03

根据《伯杰氏鉴定细菌学手册》第 9 版将李斯特菌属(*Listeria*)分为 2 个群 7 个种,单核细胞增生李斯特菌(*L. monocytogenes*, 简称 LM)为其中 1 个菌种。LM 为革兰阳性球杆菌,广泛存在于土壤和饲料中,健康人群、家养及野生动物都被认为是该菌的携带者。LM 对营养要求不高,能在普通培养基上生长,在血平板上能形成狭窄透明的溶血环。并且 LM 对低温有较强的耐受性,因此长期放置在冰箱内的食物容易查出该菌。根据菌体抗原和鞭毛抗原,LM 可分为 16 个血清型,包括 1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e、5、6a、6b、7。主要以血清型 1/2a、1/2b 和 4b 对人致病,约占全球该病病例数的 90%^[1]。

LM 是一种典型的能够寄生于巨噬细胞、上皮细胞、内皮细胞和肝细胞胞内的寄生菌,一旦引起人畜共患传染病的发生,其病死率高达 20%~70%^[2]。美国食品药品监督管理局(FDA)规定即食食品中不得检出 LM,而世界卫生组织将其列为 20 世纪 90 年代 4 大食源性致病菌之一。1997 年 3 月和 8 月在我国云南省某县一自然村内先后两次暴发动物源性李斯特菌病,造成村内牲畜大量死亡,动物病死率约为 100%,人群发病率分别为 8.2%和 8.6%^[3]。近年来我国多次在美国、加拿大、法国、爱尔兰、比利时、丹麦等进口肉类中检测出李斯特菌。据加拿大公共卫生署(PHAC)报道,加拿大每年约有 100~140 人感染 LM,大约死亡 30~50 人。据美国食品药品监督管理局(FDA)报道,美国每年约有 2 500 人感染 LM,其病死率高达 20%~30%。人群主要通过食用被 LM 污染的食物而致病,目前 LM 已被广泛认为是导致食源性传染性疾病暴发流行和散发病例的重要致病菌。而细菌生物学分型、噬菌体分型和多位点酶电泳等传统的血清学分型鉴定方法均不能将所有从食品、患者和环境分离的 LM 进行有效的分型检测,不能满足现代流行病学分子生物学调查研究的需要。因此,具有高分辨率、自动化、快速、稳定和重复性好等特点的现代分子生物学分型方法就更加受到国内外研究者的青睐,而相继出现的脉冲场凝胶电泳(PFGE)、基因芯片技术、DNA 环介导恒温核酸扩增法及焦磷酸测序法则具有上述特点。本文现就针对 LM 的现代分子生物学分型检测方法及其研究进展进行综述。

1 PFGE

随着 PFGE 方法的不断改进和完善,该方法已经用于沙门菌、肺炎链球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌等常见病原体的分子流行病学调查和分子分型研究。近年来 LM 的检测与分型也常采用 PFGE。PFGE 具有分辨率高、敏感性强、重复性好等特点,能区分其他方法不能鉴别的菌株(包括 LM 的 4b 型),

因此被认为是细菌分型的“金标准”^[4]。在 PFGE 特定的电泳系统中,通过电场方向的不断交替变换及适宜的脉冲时间等条件,包埋于凝胶中的细菌 DNA 大片段能够得到很好的分离,形成清晰的图谱。不同的脉冲时间其分离的 DNA 片段大小不同,脉冲时间 5~40 s,可以分离(50~600)×10³ 的 DNA 片段。此外,电压、脉冲角度、电泳温度、缓冲液离子浓度等也是不容忽视的条件。在制作凝胶包埋细菌时,细菌浓度对于能否得到高质量、清晰的图谱也至关重要,需要对其进行严格的要求。为了能够在最短的时间内得到最好的电泳图谱,许多研究者都致力于建立快速的 PFGE 分型方法,改进该方法的各个环节。Briczinki 等^[5]研究报道,用快速 PFGE 法检测 1 d 即可得到与其他分型方法完全一致的结果,提示 PFGE 的改进可以提供方便、快速和准确的细菌分子生物学分型方法。这对以后的细菌分子分型和分子流行病学调查起到了积极的推动作用。

Howard 等^[6]在进行 PFGE 的过程中采用限制性核酸内切酶 *Apa* I、*Asc* I、*Not* I 和 *Sma* I 对 LM 进行酶切,可以获得满意的大片段 DNA 分子。其中 *Apa* I 的分辨力强于 *Sma* I,其酶切后产生的条带数目少于 *Sma* I,图谱清晰易读^[7]。虽然 *Apa* I 的分辨力也强于 *Asc* I,但由于 *Asc* I 酶切后只产生 8~14 个 DNA 片段,较 *Apa* I 酶切后产生的 DNA 片段数(18~23 个)少,因此 *Asc* I 酶切后所得数据更易解释。病原菌分子分型实验室监测网络(PulseNet)推荐,在使用 PFGE 鉴别 LM 的过程中联合应用限制性内切酶可提高 PFGE 的分辨力。例如当分析流行病学相关的菌株是否为同一型别时,可联合使用 *Apa* I 和 *Asc* I 酶将其区分(包括 4b 型),且结果也易于观察和解释。PFGE 已成为 LM 分型的最优方法之一^[8]。目前国内外主要是采用限制性内切酶 *Apa* I 或(和) *Asc* I 对 LM 进行 PFGE 分型。在美国 1998 年与 2002 年先后发生的 2 次由 LM 引起的暴发流行事件中,PulseNet 实验室正是采用 PFGE 分型方法成功地追踪到传染源^[9]。

然而,该方法也存在一定的局限性。在细菌基因变异的情况下,由于 PFGE 只能提供有限的遗传信息,不能鉴别特点基因的存在和缺失。并且由于点突变、缺失或插入等单一基因事件的发生,PFGE 在长期的流行病学研究中显得并不稳定。此外,限制性内切酶只能对大多数血清型的 LM 菌株进行酶切,虽然联合应用限制性内切酶可以提高检测的稳定性,但却导致实验时间的延长。这些问题都有待进一步的探讨和解决。

2 基因芯片技术

基因芯片技术是 20 世纪 90 年代初发展起来的一种全新

^{*} 基金项目:国家质检总局科技计划项目(2011IK165);贵州省高层次人才科研条件特助经费项目(TZJF-2011-18)。

微量分析技术,有着自动化、高通量、集成化等突出特点,其在微生物重要基因(如抗药基因、毒力基因、致病因子)的筛选监测和基于细菌基因组的流行病学研究中得到了广泛的研究,尤其是近年来基因芯片和液相芯片的研究。其原理:提取的生物标本 DNA 经 PCR 扩增后制备荧光标记探针,然后与提前点样于芯片表面的寡核苷酸杂交,最后通过检测杂交信号的强度和分布来确定检测样品中特定微生物的存在和丰度。Chizhikov 等^[10]采用寡核苷酸芯片研究了大肠杆菌、志贺菌、LM 及沙门菌株的抗原决定簇和毒力因子与其致病性的关系,发现细菌毒力基因经多重 PCR 扩增后,结合基因芯片杂交筛选方法完全可以用于某些肠道致病菌的分析检测。Wilson 等^[11]研发出一套可同时检测 18 种致病菌(包括原核生物和真核生物)的多病原体识别微阵列,对炭疽杆菌的检测极限可达 10 fg。LM、大肠杆菌 0157 和沙门菌等致病菌是危害食品安全的主要致病菌,研发出快速、准确、自动化的检测方法已成为确保食品安全的重要任务。

Volokhov 等^[12]以 LM 的 6 个毒力因子基因(hly, inlB, plcA, plcB, clp, iap)为靶基因建立了检测和鉴别 LM 的基因芯片技术,可简便、迅速地检测 LM 的 6 个基因型。Borucki 等^[13]采用 585 个探针建立了一个混合基因组芯片,通过对 24 株 LM 进行分析表明,该芯片对主要致病血清型可以作出良好的分析,所得聚类结果和系统进化分支结果一致;此外,还可鉴别同一血清型的不同菌株,并发现了一些可用于流行病学研究的遗传标记。胡瑞等^[14]利用多指标同步分析(xMAP)液态芯片技术在 4 h 内成功地检测出了包括 LM 在内的 4 种引起食源性病害的重要病原菌,其灵敏度可高达 200 cfu/mL。尽管基因芯片技术在实际应用中还存在检测费用较高、实验室应用过程中的标准化及前期研发投入高昂等问题,但它已在病原菌的基因分型和菌种鉴定方面展示了非常广阔的应用前景^[15]。

3 DNA 环介导恒温核酸扩增法

DNA 环介导恒温核酸扩增法(LAMP)是一种连续、恒温、基于酶反应的,可用于细菌和病毒的定性检测的新型核酸扩增方法,具有高特异性和等温快速扩增的特点。其原理:针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异的引物,利用一种链置换 DNA 聚合酶(BstDNA polymerase)在 65 ℃左右恒温保存几十分钟,即可完成核酸扩增反应,且 1 h 内可扩增靶基因至 10^{10} 倍。反应过程不会受到反应混合物的影响且受非靶序列 DNA 分子的影响较小。同时,在等温条件下扩增,不会因温度的改变而造成时间损失,并且模板也不需要再进行热变性,从而保证了 LAMP 扩增的高效特异性。LAMP 具有操作快捷、简便、实验装置简单、费用低廉和可以通过肉眼判断目的基因扩增与否等优点。在李斯特菌属中保守且特有的是编码李斯特菌溶血素(LLO)的 hly 基因。马保华等^[16]使用商业化的 LAMP 试剂盒在进口冻肉中检出 7 份 LM 阳性的样品,并与常规检验方法进行对比实验,表明采用 LAMP 技术检测 LM 的准确率可达 100%。易海华等^[17]采用 LAMP 与 PCR 方法同时检测 LM 的 hly 基因并进行对比,结果显示 LAMP 比 PCR 的灵敏度高 100 倍以上。但是该方法所需要设计的引物数量相对较多、结构复杂,尤其在病原体出现高度变异的时候难以进行。同时,在设计引物时还必须考虑靶序列的片段和茎环结构等因素。此外,该方法每次反应只能检测一个病原菌,其阳性反应也并不单是呈现单条带,容易出现拖尾和一些低分子质量的条带,且一旦产生非特异性扩增就不易鉴别。

4 焦磷酸测序技术

在细菌鉴定分型的分子生物学方法中,能够提供核酸碱基

序列资料的分子诊断技术成为细菌鉴定分型的金标准。在利用 Sanger 法的 DNA 测序技术中,所测 DNA 长度可达 1 000 bp。但是在实际工作中,如果引物选择恰当,只需要通过分析已知 DNA 序列片段中的几十对碱基即可满足细菌分型检测的需要^[18],而近几年发展起来的焦磷酸测序技术就能达到该要求。

焦磷酸测序技术是一种准确、快速、实时进行短片段 DNA 序列分析的方法,是一种依靠生物发光进行 DNA 序列分析的技术。在 DNA 聚合酶、荧光素酶、腺三磷酸双磷酸酶和硫酸化酶的协同作用下,将引物上每一个 dNTP(dATP_αS、dTTP、dCTP、dGTP)聚合与一次荧光信号释放偶联起来,通过检测荧光的释放和强度达到测定 DNA 序列的目的。新发展的焦磷酸测序技术无须对 DNA 片段进行荧光标记,也无须进行电泳,因此相应的仪器系统就不需要荧光分子的激发和检测装置^[19]。李秀娟等^[20]在用焦磷酸测序技术对 LM 的 hly 基因保守序列进行测序时发现第 7 个碱基的 A 与 G 置换,从而可以建立用焦磷酸测序技术对 LM 进行分子分型的方法。尽管用该方法进行分型有可能分型的种类较少,但是通过测序、分型一项实验就能完成,并且其结果可靠、稳定、操作简单,极大地减少了常规检测和分型的工作量。

5 展 望

由于 LM 分布广,适应能力强,对人类威胁较大,能使人致病的最小致病浓度尚不清楚,因此研发简单快速、灵敏高效、成本低、自动化程度高的检测技术显得非常重要。但是,目前还没有一种方法可以同时兼备以上优点。病原微生物的高通量检测技术是近年发展起来的前沿技术,在病原微生物的检测分型和预防控制领域具有十分重要的应用价值。由于其所需样品和剂量较少、快速省时、诊断结果精确、自动化操作程度较高,适宜用于食源性病原微生物的诊断与分型。PFGE、LAMP、基因芯片技术和焦磷酸测序技术等检测方法各有其优缺点,对这些技术在病毒、细菌的分型检测及传染病监控等方面的应用已经进行了大量研究。相信随着研究的不断进展和深入,这些高通量诊断分型技术和方法会不断完善,在食源性传染病病原体检测分型方面起到更加重要的作用。

参考文献

- [1] 唐家琪. 自然疫源性疾病[M]. 北京:科学出版社,2005: 899-912.
- [2] 沈莹. 单核细胞增生性李斯特菌在食品安全中的研究近况[J]. 中国热带医学,2008,8(3):484-487.
- [3] 肖义泽,任丽娟,王金玉,等. 云南省首次动物源性李斯特菌暴发的流行病学调查[J]. 中华流行病学杂志,2000, 21(3):236.
- [4] Fakhr MK, Nolan LK, Lague CM. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. J Clin Microbiol, 2012, 43: 2215-2219.
- [5] Briczinki EP, Roberts RF. Technical note: a rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of bifidobacteria[J]. J Dairy Sci, 2006, 89(7): 2424-2427.
- [6] Howard PJ, Harsono KD, Luchansky JB. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(2): 709-712.

[7] Vela AI, Fernandez-garayzabal JF, Vazquez JA, et al. Molecular typing by pulsed-field gel eletrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 67(12): 5840-5843.

[8] Boerlin P, Bannerman E, Jemmi T, et al. Subtyping *Listeria monocytogenes* isolates genetically related to the Swiss epidemic clone[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(9): 2148-2153.

[9] Graves LM, Hunter SB, Ong AR, et al. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet Network[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2350-2355.

[10] Chizhikov V, Rasooly A, Chumakov K, et al. Microarray analysis of microbial virulence factors[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3258-3263.

[11] Wilson WJ, Strout CL, DeSantis TZ, et al. Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology[J]. Mol Cell Probes, 2002, 16(2): 119-127.

[12] Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, et al. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(12): 4720-4728.

[13] Borucki MK, Krug MJ, Muraoka WT, et al. Discrimination among *listeria monocytogenes* isolates using a mixed genome DNA microarray[J]. Vet Microbiology, 2003, 92(4): 351-362.

[14] 胡瑞, 赵金银, 陈德坤, 等. 应用 XMAP 液态芯片多重快速检测四种病原微生物的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(12): 2232-2235.

[15] 詹鉴峰, 郭维值. 病原菌鉴定分型方法的研究概况[J]. 海峡预防医学杂志, 2006, 12(2): 26-28.

[16] 马保华, 李贺, 高家明, 等. 使用 LAMP 技术快速检测单增李斯特氏菌[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(12): 42-44.

[17] 易海华, 祝长青, 宋阳威, 等. 食品中单增李斯特菌环介导等温扩增检测技术[J]. 食品科学, 2011, 32(4): 203-207.

[18] Gharizadeh B, Kalantari M, Garcia CA, et al. Typing of human papillomavirus by pyrosequencing[J]. Lab Invest, 2001, 81(5): 673-679.

[19] 倪红兵, 鞠少卿, 王惠民. 焦磷酸测序技术及其应用进展[J]. 国外医学: 临床生物化学与检验分册, 2005, 26(9): 600-605.

[20] 李秀娟, 徐保红, 田会芳, 等. 焦磷酸测序法检测单增李斯特菌[J]. 中国卫生检验志, 2010, 20(7): 1623-1625.

(收稿日期: 2014-07-26 修回日期: 2014-10-17)

(上接第 842 页)

吻合术。李从谊等^[10]在采用改良式泪囊鼻腔吻合术治疗鼻泪管阻塞患者的临床疗效研究中发现, 患者的治疗总有效率高, 复发率小, 效果显著。本研究中观察组采用鼻内窥镜下改良式泪囊鼻腔吻合术进行治疗, 结果同样显示观察组治疗总有效率高, 且泪囊炎复发率低于对照组, 组间比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明鼻内窥镜下改良式泪囊鼻腔吻合术的治疗效果明显提高, 手术风险显著下降; 并且在患者的康复过程中疾病的复发率较低, 同时不会影响患者的正常工作与生活, 帮助患者达到了较为理想的康复状态。这切实地满足了患者的心理及生理需求, 有利于减少医患矛盾和冲突。

此外, 由于鼻内窥镜下改良式泪囊鼻腔吻合术的操作过程比较容易, 采用的医疗设备较为简单、技术相对先进, 在提高治疗效果的同时降低了手术难度。刘军英^[11]在改良式泪囊鼻腔黏膜吻合术的临床研究中发现, 为了手术的顺利进行, 在行改良式鼻腔泪囊吻合术时必须准确地定位泪囊在鼻腔外侧壁的投影部位, 由于该投影位于中鼻道前段, 且位置相对固定, 因此可以采用一些较为简单的方法进行确定, 以减少手术时间。并且, 采用改良式鼻腔泪囊吻合术后, 有效地减少了因医生经验不足而导致的治疗过程中出现的各种不良反应。但值得注意的是, 部分慢性泪囊炎患者可能合并一些较为特殊的疾病, 可能会对治疗效果造成一定的影响。因此, 在手术之前, 需对患者进行全面的检查, 提高手术的安全性, 减少对患者的负面影响。

综上所述, 采用鼻内窥镜下改良式泪囊鼻腔吻合术治疗慢性泪囊炎具有较好的临床疗效, 并且可以降低患者的疾病复发率, 值得在临床中推广应用。

参考文献

[1] 张晓亮, 向宇燕. 泪囊鼻腔吻合术的解剖学研究及应用进

展[J]. 解剖学研究, 2011, 33(2): 150-152.

[2] 纪科, 夏贵华, 刘绍胜, 等. 经鼻内镜鼻腔泪囊吻合术临床分析[J]. 现代实用医学, 2010, 22(8): 929-930.

[3] 蔡运杆, 李亘, 温太佩. 鼻内窥镜下泪囊鼻腔开放术治疗慢性泪囊炎[J]. 赣南医学院学报, 2011, 31(2): 224-225.

[4] 雷海云, 韦鹏. 贝复舒在经鼻内镜鼻腔泪囊造孔术中的临床应用[J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(1): 147-149.

[5] 黄起基, 李文章, 杨桂花. 鼻内窥镜下泪囊鼻腔造孔术治疗慢性泪囊炎[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2010, 32(12): 950-951.

[6] 曾远付, 梁玲玲, 陈乐民, 等. 鼻内窥镜下泪囊鼻腔造瘘术治疗慢性泪囊炎的疗效[J]. 实用临床医学, 2011, 12(6): 85-86.

[7] 谢希翔, 刘洪斌. 鼻内镜鼻窦术后醋酸曲安奈德注射迎香穴的疗效和安全性[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(1): 61-63.

[8] 周松. 鼻内窥镜下鼻腔泪囊造口术治疗慢性泪囊炎的疗效观察[J]. 成都医学院学报, 2011, 6(2): 172-174.

[9] 杜红, 郭晓蓝, 唐志英, 等. 鼻内窥镜下泪囊鼻腔造孔术治疗复发性泪囊炎[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(7): 1505-1507.

[10] 李从谊, 夏鸿慧. 改良式泪囊鼻腔吻合术治疗鼻泪管阻塞患者的临床疗效分析[J]. 临床医学工程, 2012, 19(8): 1322-1323.

[11] 刘军英. 改良式泪囊鼻腔黏膜吻合术的临床观察[J]. 滨州医学院学报, 2012, 35(1): 70-71.