

# 一起皮肤炭疽疫情中炭疽杆菌分子特征分析

谈忠鸣,张忠献,董晨,胡建利,鲍倡俊,汤奋扬,朱叶飞\*

(卫生部肠道病原微生物重点实验室,江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的:对引起2012年江苏省一起皮肤炭疽疫情的炭疽杆菌进行分子特征分析。方法:采用聚合酶链式反应对患者焦痂标本和病牛组织标本进行炭疽杆菌多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)和保护性抗原(protective antigen, PA)基因扩增并测序分析。结果:4例患者焦痂标本和病牛组织标本中的炭疽杆菌具有相同的多位点序列和保护性抗原基因序列,分别为ST1型和PA I型,并与国际参考株 str. Ames Ancestor 具有相同的基因型。结论:此次皮肤炭疽疫情中通过牛感染人的炭疽杆菌为ST1型和PA基因I型菌株。

**[关键词]** 炭疽疫情;炭疽杆菌;多位点序列分型;保护性抗原基因

**[中图分类号]** R181.2\*6

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-436-03

doi:10.7655/NYDXBNS20150331

炭疽是由炭疽芽孢杆菌引起的一种人兽共患病,主要发生在牛及其他食草哺乳动物身上。人通过呼吸道、消化道和皮肤接触可感染肺炭疽、胃肠炭疽和皮肤炭疽,以皮肤炭疽最为常见<sup>[1]</sup>。炭疽杆菌不仅是引发炭疽的病原菌,还被联合国《禁止生物武器公约》列为生物战剂,同时也是公认的生物恐怖武器。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是一种基于多个管家基因序列测定分析的基因分型方法,具有快速、准确、重复性好的特点,并且可与全球范围内实验室进行数据交流与共享,已用于炭疽杆菌的基因分型研究<sup>[2]</sup>。

炭疽杆菌的外毒素由保护性抗原(protective antigen, PA)、致死因子(lethal factor, LF)和水肿因子(edema factor, EF)3种多肽组成<sup>[3]</sup>。其中PA蛋白可结合LF和EF并帮助二者穿膜,单独的PA蛋白无毒,但能诱导机体产生免疫作用,是炭疽疫苗的主要抗原成分。2001年Hoffmaster等<sup>[4]</sup>利用PA抗原测序分型方法,将美国生物恐怖袭击中的炭疽杆菌菌株与美国国内的散发菌株进行了区分。

2012年8月,江苏省连云港市发生了一起几名村民宰杀病牛后出现皮肤炭疽的疫情。本实验室对上述疫情的标本(4例病例的焦痂标本和1份病牛

肉标本)进行MLST和PA抗原基因序列分析以确定其基因型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

4例皮肤炭疽病例焦痂标本及病死牛肉标本由赣榆县疾控中心送至本实验室。牛肉标本取25 mg,放入2 ml无菌EP管中;患者焦痂标本直接放入2 ml无菌EP管中。各管加入200  $\mu$ l 无菌生理盐水,研磨混匀成组织悬液。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 核酸提取

采用美国QIAGEN公司试剂盒QIAamp DNA mini kit提取DNA,操作步骤参照试剂盒使用说明书,核酸-80 $^{\circ}$ C保存待用。

#### 1.2.2 等位基因扩增

根据MLST数据库(<http://pubmlst.org/bcereus>)和文献报道<sup>[3,5]</sup>,对炭疽杆菌7个管家基因(glpF、gmk、ilvD、pta、pur、pycA、tpi)进行扩增。反应体系为:10  $\times$  TaKaRa LA buffer 5  $\mu$ l, dNTPs 4  $\mu$ l, 10  $\mu$ mol/L 上下游引物各2  $\mu$ l, 5U TaKaRa LA Taq酶0.3  $\mu$ l, DNA模板2  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O补足50  $\mu$ l。退火温度分别为:56 $^{\circ}$ C (gmk、pta、pur), 57 $^{\circ}$ C (pycA), 58 $^{\circ}$ C (ilvD、tpi), 59 $^{\circ}$ C (glpF)。PCR扩增仪为美国ABI公司的9800 Fast Thermal Cycler。PCR产物用1.5%琼脂糖电泳分析结果。

#### 1.2.3 PA基因扩增

PA基因扩增片段总长度为2 531 bp,采用普通

**[基金项目]** 十二五”科教兴卫工程(ZX201109、RC2011085);江苏省预防医学项目(Y2012093)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: jszyf@jscdc.cn

PCR 方法分两段扩增<sup>[6]</sup>,中间有 109 bp 重叠,引物序列见表 1,反应体系同上。条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,62 °C 30 s,72 °C 1.5 min,35 个循环;72 °C 5 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖电泳分析结果。

表 1 炭疽杆菌 PA 基因引物序列

Table 1 PCR primers for pA of *Bacillus anthracis*

基因	引物序列(5'→3')	产物长度 (bp)
PA-1	F:ATATTTATAAAAAGTTCTGTTTAAAAAGCC R:TAAATCCTGCAGATACACTCCAC	1 191
PA-2	F:ATAAGTAAAAAATACTTCTACAAGTAGGACAC R:GATTTAGATTACTGTTTAAAAACATACTCTCC	1 449

### 1.2.4 测序与序列分析

TaKaRa Mini Best Agarose Gel DNA Extraction Kit (TaKaRa 公司,日本)回收 PCR 产物并直接测序,测序仪为 Applied Biosystems/HITACHI 3500xL (日立公司,日本)。测序结果用 Lasergene 软件包和 MEGA 4.0 软件进行分析<sup>[7]</sup>。

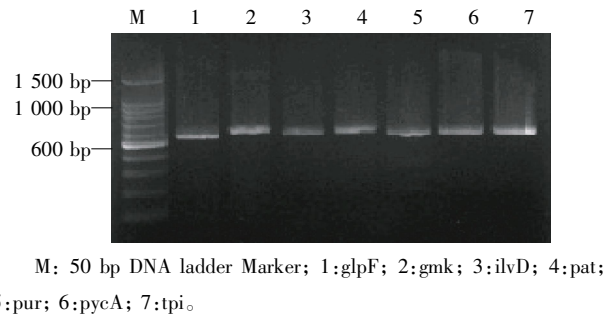
## 2 结果

### 2.1 管家基因扩增及序列分析

4 份患者标本和 1 份牛肉标本全部扩增出 7 个管家基因(图 1)。测序结果显示 5 份标本的序列完全相同。与 MLST 数据库等位基因信息对比,得到菌株的基因型为 ST1 型(1-1-1-1-1-1),与国际参考株 str. Ames Ancestor 同为一个基因型。7 个管家基因序列拼接后与其他炭疽杆菌 ST 基因型序列进行聚类分析,结果显示 7 个炭疽 ST 型聚类为两个大组,ST1、ST2、ST3、ST134 和 ST135 聚为一大组,ST552 和 ST553 为另一组。

### 2.2 PA 基因扩增分析

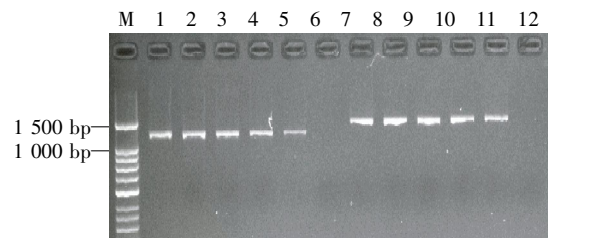
4 例皮肤炭疽病例的焦痂标本和病牛肉标本分别进行 PA 基因扩增,结果显示在 1 200 bp 和 1 500 bp 附近出现目的条带(图 2)。测序结果拼接为 2 531 bp 的碱基序列,MEGA 4.0 软件分析后显示 4 例皮肤炭疽病例的焦痂标本和病牛肉标本中



M: 50 bp DNA ladder Marker; 1: glpF; 2: gmK; 3: ilvD; 4: pat; 5: pur; 6: pycA; 7: tpi。

图 1 炭疽杆菌 7 个管家基因 PCR 产物电泳图

炭疽 PA 基因序列完全一致。GenBank 中比对后发现与国际参考株 str. Ames Ancestor、str. A2012、str. A2048 及疫苗株 A16R 完全相同,并鉴定为 PA 基因 I 型(图 3)。



M: 50 bp DNA 梯度 Marker; 1: 病例 1 PA1; 2: 病例 2 PA1; 3: 病例 3 PA1; 4: 病例 4 PA1; 5: 病牛 PA1; 6: PA1 阴性; 7: 病例 1 PA2; 8: 病例 2 PA2; 9: 病例 3 PA2; 10: 病例 4 PA2; 11: 病牛 PA2; 12: PA2 阴性。

图 2 PA 基因 PCR 产物电泳图

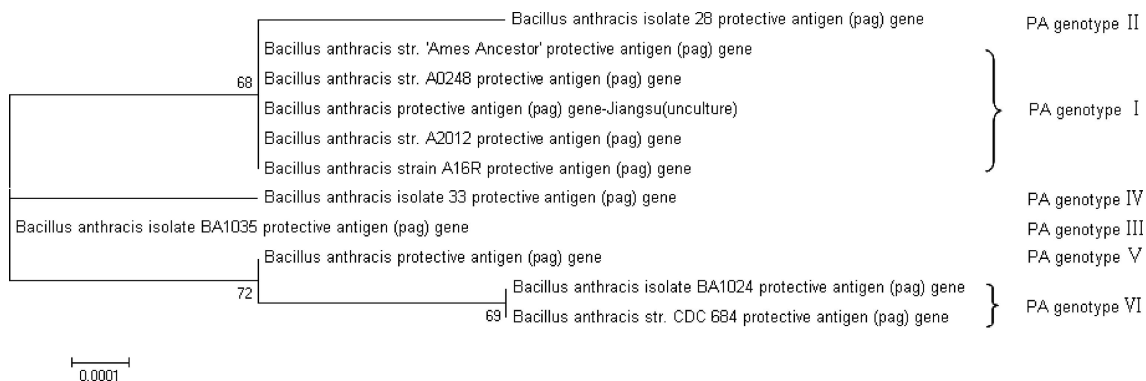


图 3 PA 基因序列聚类图

### 3 讨论

炭疽杆菌是炭疽病的病原体,能以芽孢形态在土壤中长期存活,这种特性造成炭疽杆菌的基因组序列高度保守。炭疽杆菌主要通过呼吸道、肠道和皮肤接触感染人类,其中以皮肤型炭疽最为常见。由于炭疽芽孢在环境中的抵抗力极强,易生产,常被用于生物战武器或生物恐怖袭击。

MLST 技术于 1998 年首次用于脑膜炎奈瑟菌,经过多年发展,已应用在 30 多种病原菌的遗传、进化及溯源研究中。MLST 数据库中已有 7 个炭疽杆菌 ST 型。上传的大部分炭疽杆菌菌株为 ST1 型,其中包括国际标准株 str. Ames Ancestor 和 str. Sterne。当前数据库中有 3 株炭疽杆菌来自中国,1 株 ST1 型于 1990 年分离自患炭疽的家畜,2 株新的 ST 型(ST552 和 ST553)从我国东北地区的病牛体中分离<sup>[8]</sup>。

PA 基因位于炭疽杆菌的质粒 PX01 上,是炭疽毒素的重要组成部分,在毒素转运方面起关键作用,同时也是炭疽疫苗的主要抗原<sup>[9]</sup>。对 PA 基因的研究可以更好地了解炭疽的毒力及其进化。1999 年建立了 PA 测序分型方法并将 26 株炭疽杆菌分为 6 个 PA 基因型。2001 年利用此方法将美国生物恐怖袭击中的炭疽杆菌菌株与散发菌株进行了区分<sup>[3]</sup>,其中进行生物恐怖袭击的炭疽杆菌为 PA I 型,美国国内散发株为 PA VI 型,说明此方法可辅助确认炭疽爆发、生物恐怖袭击或发现散发炭疽菌株间的潜在联系。此次皮肤炭疽疫情中通过牛感染人的炭疽杆菌为 PA 基因 I 型菌株,与参考株 Ames Ancestor 株、A2012 株、A2048 株和 A16R 疫苗株同为 PA 基因 I 型。PA 基因 II、III 和 IV 型虽然和 I 型存在碱基突变,但均为同义突变,所编码的氨基酸保持不变,说明 A16R 疫苗株具有一定的代表性。

江苏省连云港市历史上从未发生过炭疽疫情,此次皮肤炭疽疫情为屠宰场从外省购进病牛所致。在政府、公安、农林和疾控等多部门合作下,及时控制了疫情。本实验室运用两种分子分型方法对患者

和病牛标本进行分析,结果显示感染人和感染病牛的炭疽杆菌拥有相同的基因型,且均与参考株 Ames Ancestor 株为同一基因型。结合流行病学调查结果,确认此次皮肤炭疽疫情由村民宰杀了感染 ST1 型、PA 基因 I 型炭疽杆菌的牛引起。

#### [参考文献]

- [1] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. Anthrax in humans and animals [M]. 4th Edition. Switzerland: WHO Press, 2008: 36-38
- [2] Kim K, Cheom E, Wheeler KE, et al. Determination of the most closely related bacillus isolates to *Bacillus anthracis* by Multilocus sequence typing [J]. Yale J Biol Med, 2005, 78(1): 1-14
- [3] 李伟, 俞东征. 炭疽芽孢杆菌重要生活活性基因及其调控 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(5): 445-448
- [4] Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, et al. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(10): 1111-1116
- [5] Tourasse NJ and Kolsto AB. SuperCAT: a supertree database for combined and integrative multilocus sequencetyping analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*) [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36 (1): D461-D468
- [6] Price LB, Hugh-Jones M, Jackson PJ, et al. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(8): 2358-2362
- [7] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599
- [8] 左庭婷, 李岩伟, 韩雪莲, 等. 两株炭疽芽孢杆菌 MLST 新序列型(ST) [J]. 微生物学报, 2012, 52(1): 120-123
- [9] 吕洪臻, 唐小军, 熊四平, 等. 抗炭疽毒素保护性抗原单克隆抗体的制备及功能分析 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 33(11): 1497-1501

[收稿日期] 2014-09-10