

广东地区嗜肺军团菌的扩增片段长度多态性分析

胡朝晖¹, 屈平华², 刘元力¹, 朱庆义^{1*}

(¹广州金域医学检验中心, 广州 510330)(²广州市疾病预防控制中心, 广州 510080)

摘要:【目的】了解广东部分地区 2002~2007 年环境水中嗜肺军团菌的基因型及遗传学关系。【方法】参考欧洲军团菌感染工作组 (the European Working Group for *Legionella* Infections, EWGLI) 制定的分型草案 (1.2 版), 采用 *Pst* I 酶对我室保存的 2 株标准菌株及 41 株不同时间、不同地点的嗜肺军团菌环境分离株进行扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分析, 电泳图谱与 EWGLI 进行比对。【结果】AFLP 分型结果稳定, 重复性好; 43 株嗜肺军团菌, 其不同来源菌株呈现多态性分布, 经 AFLP 分析得到 33 个基因型, 辨别力指数为 99.79%, 其中 Kingmed AFLP 011 为优势基因型。按 Dice 系数 0.8, 可分为 18 个群, Kingmed AFLP D 群为优势群, 占总菌株数的 34.88%。由电泳图谱的相似性, 初步推断存在 EWGLI 001 Lugano 型、002 Lugano、012 Rome、013 London、014 London 型、015 Dresden 型、021 Lyon 等 7 个基因型, 以及多个未报道的新基因型。【结论】广东地区嗜肺军团菌的基因型十分丰富, AFLP 技术是其分子流行病学研究的有效手段。

关键词: 嗜肺军团菌; 基因分型; 扩增片段长度多态性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 12-1659-07

军团菌是引发人类肺炎的重要病原体, 主要经呼吸道感染, 气溶胶是军团菌传播、传染的重要载体。据世界卫生组织估计, 在西欧国家, 军团菌病的发病率接近于每年 10 万例。虽然没有证据表明军团菌可以在人与人之间进行传播, 然而随着空调、供水系统的广泛应用, 军团菌病在大中城市中的影响越来越大, 已经有多个国家将军团菌肺炎定为法定传染病。目前已确认军团菌有 50 个种, 70 多个血清型, 接近 20 个种有临床分离报道, 其中嗜肺军团菌与人类疾病关系最为密切^[1]。按传统的血清学方法, 可将嗜肺军团菌分为 16 个型, 每个血清型都有临床分离报道。然而, 血清学分型鉴定的不足之处在于其容易受环境因素的影响, 且可能与他菌种之间存在共同抗原而出现交叉反应, 而由此发展而来的单克隆抗体分型同样存在稳定性差的缺陷^[2]。近年来, 与分子生物学技术相结合的基因分型方法已广泛应用于微生物的分子

流行病学研究, 扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 分析就是其中之一。该技术由一个简单的限制性酶切连接反应及接下来的 PCR 扩增组成, 对仪器设备的要求简单, 并同时具备限制性片段长度多态性分析 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 的可靠性及 PCR 的高效性等优点, 能够为军团菌的爆发提供流行病学监测资料^[3]。2002 年, EWGLI 将该技术推荐为军团菌分型的金标准方法^[4]。在我国, 由于绝大多数临床微生物实验室均未开展军团菌的分离培养, 相关的分子分型及流行病学研究报道较为少见。但是, 随着中国城市化, 军团病作为一种“现代文明病”, 已经成为一种危害人们身心健康的潜在危险因素。军团菌的分子分型研究, 对于军团菌病环境污染源的溯源性调查、流行病学监测等, 具有十分重要的意义。我室参考 EWGLI 制定的嗜肺军团菌 AFLP 分型草案, 成功地

基金项目: 广州市越秀区科技攻关项目 (2007-GX-012)

*通讯作者: Tel: +86-20-22283222 转 618; E-mail: zqy@Kingmed.com.cn

作者简介: 胡朝晖 (1970-), 男, 湖南省岳阳人, 博士研究生, 主要从事分子诊断学研究。E-mail: huzh@Kingmed.com.cn

收稿日期: 2008-03-24; 修回日期: 2008-09-03

对广州金域医检验中心 2002~2007 年期间在广州、新会两市环境水中分离的 41 株嗜肺军团菌进行了分子分型, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株:嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila* Knoxville-1) ATCC 33153, 嗜肺军团菌 (*L.pneumophila* Togus-1) ATCC 33154 由北京军事医学院微生物流行病学研究所惠赠; 环境军团菌 41 株, 为我室 2002~2007 年于广州、新会两地环境水中分离(见 2.3 节的表 1), 经生化、血清型、细胞脂肪酸成份分析及基因测序等多种手段确切鉴定嗜肺军团菌。

1.1.2 主要试剂和仪器: i-genomic CTB 基因组提取试剂盒、2 × PCR Master Mix 酶体系、Marker 等均购自北京天根生化科技有限公司; *Pst* I 内切酶、T4 DNA 连接酶购自罗氏试剂诊断有限公司; 其余为 sigma 分析纯试剂。基因扩增仪 PTC-200 购自美国 MJ Research 公司; 电泳仪、凝胶成像仪购自 Bio-RAD 公司。

1.1.3 AFLP 接头寡核苷酸、选择性引物: AFLP-LG1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'), AFLP-LG 2 (5'-TGTACGCAGTCTAC-3'), AFLP-*Pst* I-G (5'-GACTGCGTACATGCAGG-3') 由上海英峻生物工程有限公司合成。

1.2 血清学鉴定

日本生研株式会社嗜肺军团菌血清 1 型、血清 2 型、血清 3 型、血清 4 型、血清 5 型、血清 6 型乳胶凝集试剂盒, 英国 Microgen 军团菌乳胶凝集试剂盒 (包含嗜肺军团菌血清 1 型单价血清, 嗜肺军团菌 2-15 型多价血清, 军团菌种多价血清), 按说明书进行操作。

1.3 嗜肺军团菌的 AFLP 分析

嗜肺军团菌的 AFLP 分析主要包括: 基因组 DNA 提取、*Pst* I 限制片段的获得及其与接头序列的连接、*Pst* I 限制片段的特异性 PCR 扩增、凝胶电泳、电泳图谱的比较及数据分析等 5 个步骤。

1.3.1 基因组 DNA 提取: 采用 i-genomic CTB 基因组试剂盒, 按说明书操作。

1.3.2 目的片段的扩增: *Pst* I 限制片段的获得及其与接头序列的连接、*Pst* I 限制片段的特异性 PCR 扩增、凝胶电泳等步骤均参考文献[5]进行操作。

1.3.3 电泳图谱的比较及数据分析: 根据其相同分析范围内的片带数目及相对位置, 与英国卫生保健署 Fry 提供的 EWGLI AFLP 数据库文件 (Description of the Standard EWGLI AFLP Type strains by band sizes) 进行比较。按 Hunter 与 Gaston 的方法^[6], 计算 AFLP 分型的辨别力指数 (discriminative index)。聚类分析以条带的选择为基础, AFLP 扩增产物以 0、1 统计, 即在相同迁移位置上(相同分子量片断) 有扩增带的标记为 1, 无扩增带者标记为 0。在 150~2000 bp 条带分析范围内, 以 Check cross 软件, 按容许误差 2.0%、最优化位置 0.5% 方式进行处理, 形成二进制数列的距阵图。数据导入 NTSYS-pc 软件, 选择 Dice 系数, 按非算术平均数的加权配对法 (UPGMA) 进行聚类分析, 绘制遗传关系图。Dice 系数 0.8 作为相关菌源的分群依据^[7]。

2 结果和分析

2.1 嗜肺军团菌的血清学鉴定

2 株标准菌株的血清学鉴定结果与实际情况相符合, *L.pneumophila* Knoxville-1 ATCC 33153 与血清 1 型试剂、*L.pneumophila* Togus-1 ATCC 33154 与血清 2 型试剂均出现凝集。41 株广东地区分离株, 经鉴定, 主要为嗜肺军团菌血清 1 型, 共 33 株, 占 80.50%; 其次为血清 5 型, 共 4 株, 占 9.76%; 此外, 还包括 2 株嗜肺军团菌血清 6 型、1 株嗜肺军团菌血清 3 型、以及 3 株未能确切鉴定的嗜肺军团菌血清 7-15 型菌株 (见 2.3 节的表 1)。

2.2 嗜肺军团菌 AFLP 扩增

该 41 株不同菌株经 AFLP 分析, 都扩增得到带型清晰的 DNA 指纹图谱 (图 1)。对 13 与 14、28 与 29、31 与 32、36 与 40 等同一水样来源的重复实验菌株, 其指纹图谱完全一致。鉴于部分菌株在 2000~2500 bp 之间条带较淡, 且片段大小分析时容易产生误差, 故只对 150~2000 bp 之间的片段进行分析。经 Check cross 软件分析, 43 株军团菌, 在 31 条不同位置共扩增 513 条带, 平均每个菌株扩增 11.93 条带。其中 28 个不同位置的条带均具有多态性, 多态性条带占 90.32%。

2.3 嗜肺军团菌的 AFLP 分子分型及聚类分析

43 株嗜肺军团菌, 其不同来源菌株呈现多态性分布 (表 1)。计算得到的辨别力指数为 99.79%, 其

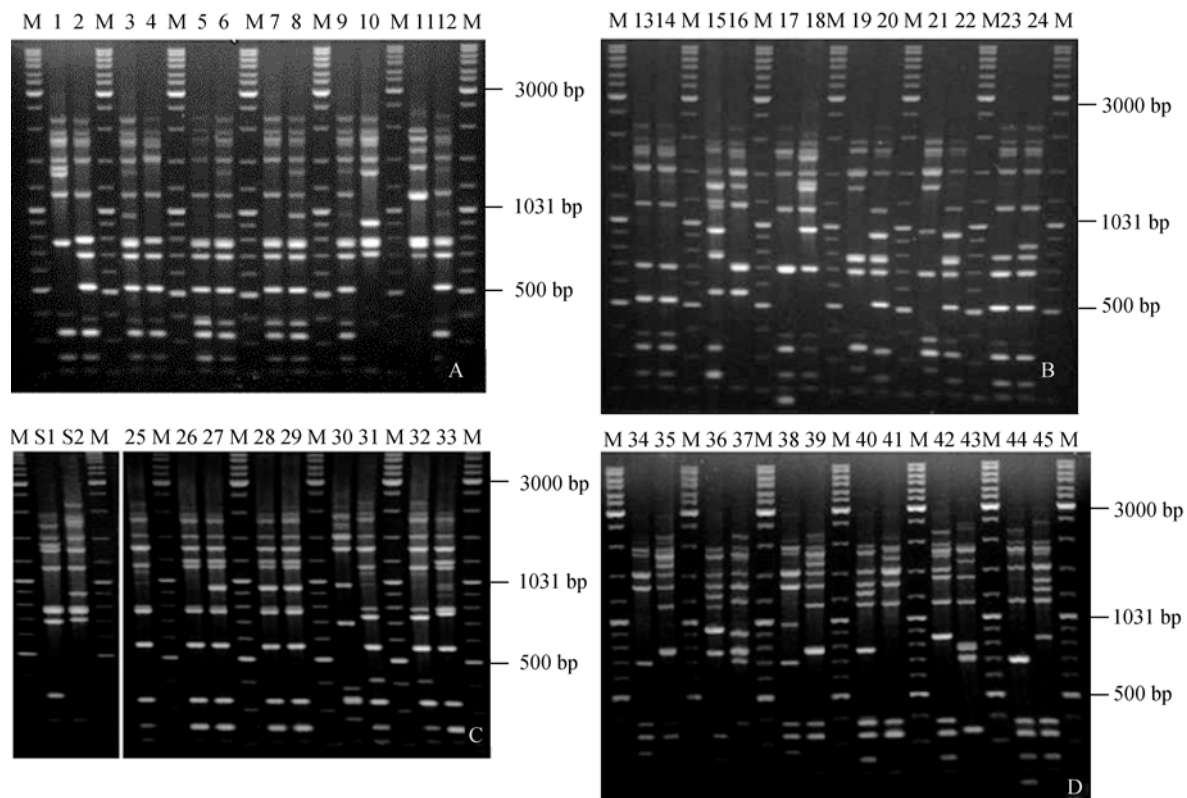


图 1 41 株嗜肺军团菌的 AFLP 分型图

Fig.1 Patterns of 41 different *Legionella pneumophila* by amplified fragment length polymorphism. S1, ATCC 33153; S2, ATCC 33154. Study codes nos.1 to 45 represented the environmental isolates of our lab. Study code nos. 13 and 14, nos.28 and 29, nos.31 and 32, nos.35 and 39 are four pairs of duplicate strains. Study code nos.3, 6, 8 and 9, nos.5 and 7, nos.2, 4 and 23, nos.17 and 44, and nos.15, 27 and 28 are five sets of identical genetic typing strains. M, GeneRuler, MBI Fermentas.

表 1 43 株嗜肺军团菌的菌株相关信息及 AFLP 分型结果

Table 1 List of the AFLP genotypes and related information for the 43 *Legionella pneumophila* strains

| AFLP groups | AFLP types | Study codes | Strain No. | Serogroup type | the most possibly EWGLI AFLP type | Source and characteristic of isolates | City of origin |
|-------------|------------|-------------|---------------------------|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| A | 001 | 1 | Kingmed-025 | <i>Lp_sg1</i> | - | air condition system in 2003 | Guangzhou (广州) |
| | 002 | 36 | Kingmed-088 | <i>Lp_sg7-15</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| B | 003 | 40 | Kingmed-063 | <i>Lp_sg3</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | 004 | 45 | Kingmed-006 | <i>Lp_sg5</i> | - | water tower in 2004 | Xinhui (新会) |
| C | 005 | 2 | Kingmed-023 | <i>Lp_sg1</i> | - | air condition system in 2003 | Guangzhou (广州) |
| | | 4 | Kingmed-019 | <i>Lp_sg1</i> | 001 Lugano | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | 006 | 23 | Kingmed-030 | <i>Lp_sg1</i> | - | air condition system in 2003 | Guangzhou (广州) |
| | | 24 | Kingmed-027 | <i>Lp_sg1</i> | - | air condition system in 2003 | Guangzhou (广州) |
| | 007 | 13(14) | Kingmed-091 (Kingmed-086) | <i>Lp_sg1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| D | 008 | 5 | Kingmed-017 | <i>Lp_sg1</i> | 014 London | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | | 7 | Kingmed-014 | <i>Lp_sg1</i> | - | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | 009 | 20 | Kingmed-054 | <i>Lp_sg1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | 010 | 22 | Kingmed-034 | <i>Lp_sg1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | 3 | Kingmed-010 | <i>Lp_sg1</i> | - | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | 011 | 6 | Kingmed-015 | <i>Lp_sg1</i> | - | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | | 8 | Kingmed-020 | <i>Lp_sg1</i> | - | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | 012 | 9 | Kingmed-008 | <i>Lp_sg1</i> | - | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | | 12 | Kingmed-002 | <i>Lp_sg1</i> | - | water tower in 2003 | Xinhui (新会) |
| | | | S1 | ATCC 33153 | <i>Lp_sg1</i> | - | human lung tissue |

续表1

| AFLP groups | AFLP types | Study codes | Strain No. | Serogroup type | the most possibly EWGLI AFLP type | Source and characteristic of isolates | City of origin |
|-------------|------------|------------------------------|------------------------------|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| E | 013 | 17 | Kingmed-068 | <i>Lp_sgl1</i> | | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | 44 | Kingmed-013 | <i>Lp_sg7-15</i> | - | water tower in 2006 | Xinhui (新会) |
| | 014 | 18 | Kingmed-067 | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | 42 | Kingmed-044 | <i>Lp_sg5</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| F | 016 | 35(39) | Kingmed-101 (Kingmed-064) | <i>Lp_sg5</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | | 15 | Kingmed-076 | <i>Lp_sgl1</i> | | surface water in 2006 |
| G | 017 | 27 | Kingmed-123 | <i>Lp_sgl1</i> | | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | 28(29) | Kingmed-113 (Kingmed-107) | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | 018 | | 26 | Kingmed-151 | <i>Lp_sgl1</i> | 015 Dresden | surface water in 2006 |
| H | 019 | 33 | Kingmed-098 | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | 020 | 25 | Kingmed-166 | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | Kingmed-103 (Kingmed-102) | <i>Lp_sgl1</i> | 002 Lugano | | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| J | 022 | 16 | Kingmed-071 | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| K | 023 | 10 | Kingmed-007 | <i>Lp_sgl1</i> | 013 London | water tower in 2003 | Xinhui (新会) |
| L | 024 | 19 | Kingmed-066 | <i>Lp_sg5</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| M | 025 | 37 | Kingmed-085 | <i>Lp_sg5</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| N | 026 | S2 | ATCC-33154 | <i>Lp_sg2</i> | - | human lung tissue | Togus |
| | 027 | 21 | Kingmed-036 | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | 38 | Kingmed-074 | <i>Lp_sg6</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| O | 029 | 34 | Kingmed-112 | <i>Lp_sg6</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| | | 30 | Kingmed-104 | <i>Lp_sgl1</i> | 021 Lyon | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| Q | 031 | 41 | Kingmed-052 | <i>Lp_sgl1</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |
| R | 032 | 11 | Kingmed-005 | <i>Lp_sgl1</i> | 012 Rome | water tower in 2003 | Xinhui (新会) |
| | 033 | 43 | Kingmed-035 | <i>Lp_sg7-15</i> | - | surface water in 2006 | Guangzhou (广州) |

“-” meant no matching.

分辨能力强。33个基因型中，Kingmed AFLP 011型为优势型，占总菌株数的11.86%；其次为Kingmed AFLP 005与Kingmed AFLP 017型，分别占总菌数的7.00%。聚类分析的结果显示，以Dice系数0.8作为相关菌源的分群依据，可将33基因型归类为18个群。其中D群为优势菌群，共8个AFLP基因型，包括*L.pneumophila* *Knozville-1*在内共15个菌株，占总菌数的34.88%，且均为嗜肺军团菌血清1型菌株。其次为G群，包括3个AFLP基因，共5个菌株，占总菌株数的11.86%（表1、图2）。

2.4 与EWGLI数据的比较及分析

将我室的AFLP分型图谱与Fry等^[8]公布的嗜肺军团菌EWGLI AFLP电泳图谱（1.1版）进行比较。由图3可见，电泳图谱在不同实验室之间具有一定的可比性，Kingmed AFLP 019型、Kingmed AFLP 032型，与EWGLI AFLP 015 Dresden、EWGLI AFLP 012 Rome电泳图谱十分相似。不同之处在于，EWGLI的最大扩增片段可达4000 bp，这可能与*Taq*酶的扩

增效率有关，我室采用的是北京天根2×PCR Master Mix酶，其性能可能要低于EWGLI组织所采用的固化*Taq*酶（Amersham Pharmacia Biotech）。EWGLI嗜肺军团菌AFLP分型草案（1.2版）对实验条件进一步规范，并以分子量Marker得到扩增片段的碱基数，形成一个由相对分子量组成型别资料的数据库文件。但由于实验条件的差异，将我室的AFLP分型数据与该数据库文件进行比较时，可比性较差。故只能根据电泳图谱的相似性，初步推断广东地区存在EWGLI 001 Lugano型、002 Lugano、012 Rome、013 London、014 London型、015 Dresden型、021 Lyon等7个基因型，以及多个未报道的新基因型（见2.3节的表1）。

3 讨论

AFLP技术是荷兰科学家ZABEAU和VOS于1993年联合开发的DNA多态性检测方法。由于该技术对于仪器设备的要求简单，在普通的PCR实验室即可

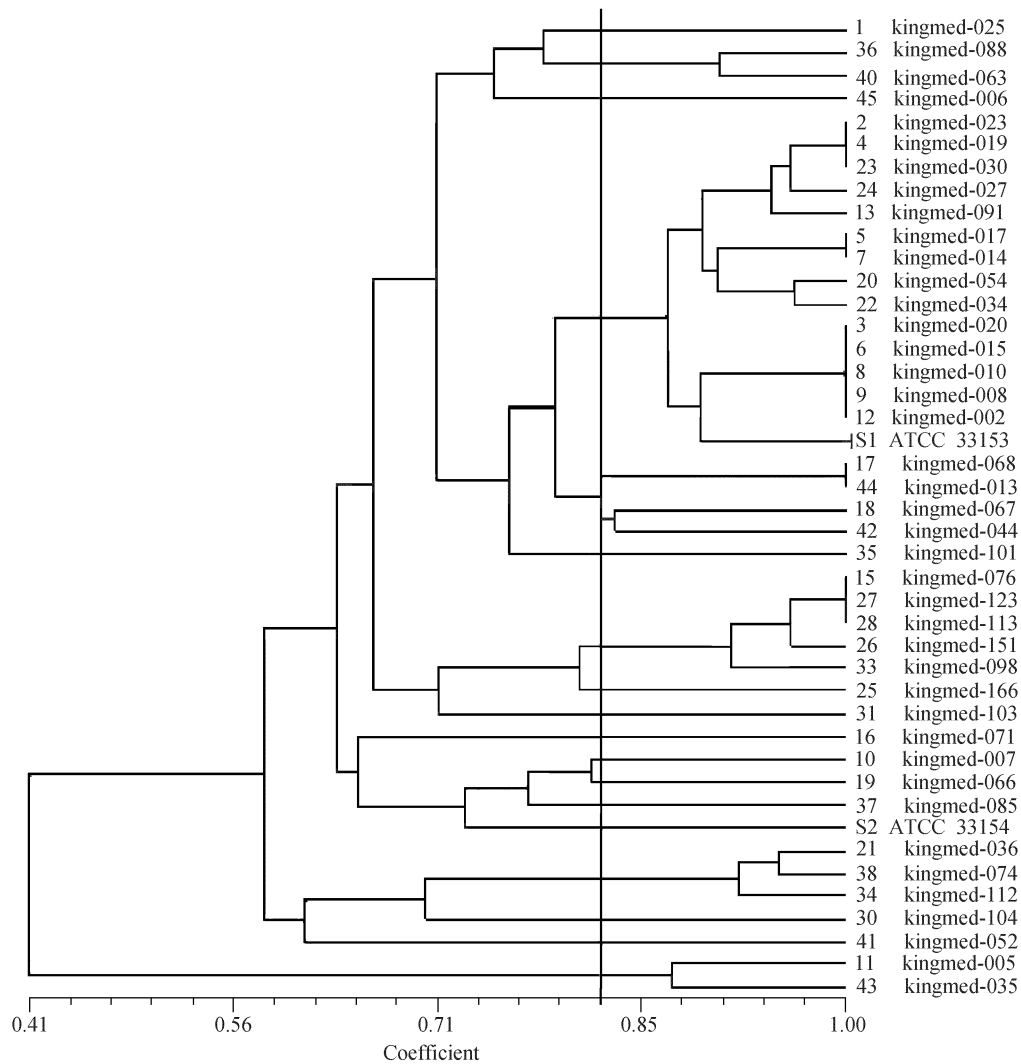


图2 43株嗜肺军团菌的AFLP聚类分析图

Fig.2 Dendrogram of AFLP, with a dice coefficient and UDPGA clustering of 43 *L. pneumophila* strains. AFLP groups were identified by a similarity index 80% dice coefficient.

完成操作,目前已广泛应用到动植物遗传作图、医学诊断、微生物分型、动植物分类和进化研究等多个领域。在国内,有霍乱弧菌、不动杆菌等多个微生物的 AFLP 分型研究报告^[8,9]。与其他文献报道的 AFLP 分型方法所不同的是,本实验采用 *Pst* 限制性内切酶进行单酶切。单酶切的优势在于,限制性酶切产物与接头进行连接后,可采用单引物进行 PCR 扩增反应,稳定性大步提高,实验结果能够在不同的实验室之间具有可比性^[3]。本研究由于实验条件的限制,未能完全按照 EWGLI 的分型草案进行操作,且采用了价格相对便宜的 2 × PCR Master Mix 酶体系进行扩增,但部分电泳图谱与 EWGLI 相比较,仍具有很大的可比性。因此,如能对相关的实验步骤进行进一步的完善和改正,将改变传统的血清学分型方法,从而迈入基

因分型的新时代。然而,AFLP 技术也存在明显的缺陷。首先,*Taq* 酶的扩增效率将直接影响扩增条带的数目。其次,与泳冲场凝胶电泳(pulse field gel electrophoresis, PFGE)相类似的是,可能会存在一些碱基数目比较接近的扩增片段,在规定的电泳条件下无法区分开来。因此,显色后的扩增条带数目,可能与实际情况并不一致。此外,*Pst* 限制性内切酶是否适合于其他细菌的 AFLP 分型,也尚需进一步探讨。

本研究发现,广东地区嗜肺军团菌的遗传多样性十分丰富,包括嗜肺军团菌血清 1 型、血清 3 型、血清 5 型、血清 6 型等多个血清型在内,共 33 个基因型。以 Dice 系数 0.8 进行分群,共得到 18 个群,Kingmed AFLP D 群为优势群,包括嗜肺军团菌 *Knoxville-1* 菌株、Kingmed AFLP 005 在内,共 8 个基因型、15 个

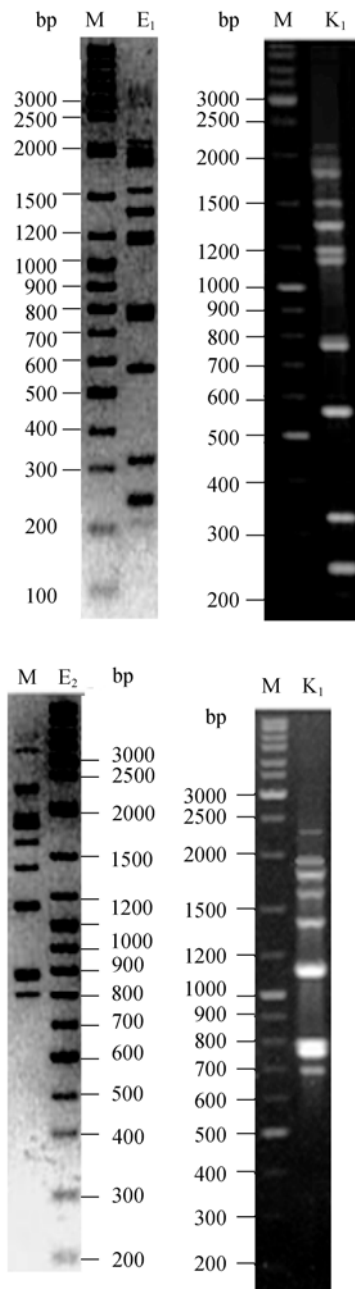


图3 嗜肺军团菌 AFLP 扩增图谱的比较

Fig.3 Comparison of the AFLP patterns for *Legionella pneumophila* between our lab and EWGLI's. E1. EWGLI AFLP 015 Dresden; K1. Kingmed AFLP 019; E2. EWGLI AFLP 012 Rome; K2. Kingmed AFLP 032; M. GeneRuler, MBI Fermentas.

菌株, 占总菌株数的 34.88%。其次为 Kingmed AFLP G 群, 占 11.63%。根据电泳图谱的相似性, 可初步推断广东地区存在 EWGLI 001 Lugano 型、002 Lugano 型、012 Rome 型、013 London 型、014 London 型、015 Dresden 型、021 Lyon 等 7 个基因型, 以及多个未报道的新基因型。Kingmed AFLP 011 型为优势基因型, 占 11.86%, 但无匹配的 EWGLI AFLP 基

因型。其次为 Kingmed AFLP 005 型、Kingmed AFLP 017 型, 分别占 7.00%。就菌株来源的多样性来看, Kingmed AFLP 005 可能为实际的优势基因型, 在新会及广州均有分离, 且电泳图谱与欧洲国家常见的 EWGLI AFLP 001 Lugano 相类似, Kingmed AFLP 017 型则与 EWGLI 015 Dresden 在相同分析范围内仅一个条带的差异, 但具体菌型尚需要进一步研究。

本研究的不足之处在于, 由于深受传统思维的禁锢, 仅采用血清学分型作为基因分型研究的基础。而血清学分型的不稳定性, 将限制基因分型的价值, 并可能影响实验室之间的数据比对。由我们的实验结果也可以看出, 血清型与基因存在不一致的结果, 菌株 Kinmed-068 与 Kingmed-013, 其 AFLP 扩增图谱完全一致, 属于同一个基因型, 但 Kinmed-068 为血清 1 型, Kingmed-013 为血清 7-15 型。近年来, 以荧光探针标记的扩增片段多态性技术 (Fluorescent amplified fragment length polymorphism) 已运用于嗜肺军团菌的基因分型^[10], 实验的灵敏性与特异性进一步提高, 自动化的仪器化操作, 也使得实验结果的比对更为方便、可靠。但就其实验结果的客观性而言, DNA 测序分型 (sequence-based typing, SBT) 更具优势^[11], 其缺点在于, 其实验成本高。对于我们这样一个发展中国家而言, 制定一个标准化的 AFLP 分型方法, 并建立相应的 AFLP 分型数据库, 是一种明智的选择。

致谢 英国卫生保健署 (Health Protection Agency, HPA) Norman Fry 博士为此稿提供 EWGLI AFLP 分型图谱及数据, 北京军事医学科学院微生物流行病学研究所协助完成嗜肺军团菌的细胞脂肪酸分析、16S RNA 基因测序, 在此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] 路风, 金银龙, 程义斌. 军团菌病的流行概况. 国外医学卫生学分册 (*Foreign Medical Sciences of Section Hygiene*), 2008, 35(2): 78-82.
- [2] Bernander S, Jacobson K, Helbig JH, *et al.* A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6):2503-2508.
- [3] Jonas D, Meyer HG, Matthes P, *et al.* Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of noso-

- comial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6): 2284–2291.
- [4] Fry NK, Bangsberg JM, Bernander S, et al. Designation of the European Working Group on Legionella Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of Legionella pneumophila serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002, 21(10): 722–728.
- [5] 屈平华, 朱庆义, 胡朝晖. 军团菌扩增片段长度多态性分析分子分型技术及其在流行病学研究中的应用. *国际检验医学杂志(International Journal of Laboratory Medicine)*, 2007, 35(2): 32–34.
- [6] Hunter PA and Gaston GA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(11): 2465–2466.
- [7] Jorgensen M, Givney R, Pegler M, et al. Typing multidrug resistant *Staphylococcus aureus*: conflicting epidemiological data produced by genotypic and phenotypic methods clarified by phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(2): 398–403.
- [8] 姜静, 刁保卫, 王洪霞, 等. 扩增片段长度多态性分析用于霍乱弧菌分子分型的方法建立和应用评价. *中华流行病学杂志 (Chinese Journal of Epidemiology)*, 2007, 28(6): 68–73.
- [9] 蔡挺, 张顺, 陈琳, 等. 鲍氏不动杆菌脉冲场凝胶电泳和扩增片段长度多态性基因分型的研究. *中华感染医学杂志 (Chinese Journal of Nosocomiology)*, 2007, 17(9): 537–542.
- [10] Fry NK, Afshar B, Visca P, et al. Assessment of fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis for epidemiological genotyping of Legionella pneumophila serogroup 1. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(9): 704–712.
- [11] Gaia V, Fry NK, Afshar B, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(5): 2047–2052.

Analysis of Legionella pneumophila isolated from Guangdong province by amplified fragment length polymorphism protocol

Zhaohui Hu¹, Pinghua Qu², Yuanli Liu¹, Qingyi Zhu^{1*}

¹Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou 510330, China

²Guangzhou Center for Diseases Control and Prevention, Guangzhou 510080, China

Abstract: [Objective] To analyze the genetic relationship and predominate genotypes among *Legionella pneumophila* isolated from Guangdong province. [Methods] In total 43 *Legionella pneumophila* strains were genotyped according to the amplified fragment length polymorphism protocol, and the obtained electropherograms were contrasted to the published standard patterns of the European Working Group for Legionella Infections. [Results] In total 33 genotypes were identified from those 43 *Legionella*, the discriminative index was 99.79%, and the Kingmed AFLP type no. 011 was predominate. In total 18 clusters were discriminated by 0.8 dice coefficient, and the Kingmed AFLP cluster D was predominate. By comparison, 7 respective genotypes had high similarity to the EWGLI AFLP type no. 001 Lugano, 002 Lugano, 012 Rome, 013 London, 014 London, 015 Dresden and 021 Lyon, and it also existed some potential new genotypes. [Conclusion] The genetic polymorphism of *Legionella pneumophila* are diverse in the environmental water of Guangdong province, and amplified fragment length polymorphism is one of the effective means for the research of molecular epidemiology.

Keywords: *Legionella pneumophila*; genotyping; amplified fragment length polymorphism

Supported by the Projects of Science and Technology Development of Yuxiu district in Guangzhou (2007-GX-012)

*Corresponding authors. Tel: +86-20-2228322 to 618, E-mail: zqy@Kingmed.com.cn

Received: 24 March 2008/ Revised: 3 September 2008