

· 实验研究 ·

深圳市 1993 - 2002 年霍乱弧菌的脉冲场凝胶电泳分析

兰全学 扈庆华 石晓路 王冰 林一曼 张顺祥 程锦泉 阙飙 徐建国

【摘要】 目的 分析深圳市 1993 - 2002 年霍乱弧菌菌株的相关性。方法 60 株霍乱弧菌基因组 DNA 经 *Not I* 酶切, 通过脉冲场凝胶电泳获得电泳图谱, 利用 BioNumerics 软件对图谱进行聚类分析。结果 60 株霍乱弧菌被分为 39 种脉冲场凝胶电泳图谱, 聚类分析将大部分菌株分为 A、B 两群。结论 深圳地区霍乱弧菌存在紧密相关的流行克隆群。霍乱弧菌的脉冲场凝胶电泳分析, 有助于霍乱的主动监测和传染来源追踪。

【关键词】 霍乱弧菌; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* isolates by pulsed-field gel electrophoresis in Shenzhen from 1993 to 2002 LAN Quan-xue*, HU Qing-hua, SHI Xiao-lu, WANG Bing, LIN Yi-man, ZHANG Shun-xiang, CHENG Jin-quan, KAN Biao, XU Jian-guo. *Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: HU Qing-hua, Email: huqinghua03@163.com

【Abstract】 Objective To determine the genetic relationships between different *Vibrio cholerae* isolates in Shenzhen from 1993 to 2002. **Methods** Chromosomal DNA from 60 isolates was digested in seakem gold agarose with restriction enzyme *Not I* and plugs were then analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *V. cholerae* isolates were clustered using BioNumerics software. **Results** 39 distinctive PFGE patterns were identified with each pattern having 20 to 30 bands. Most PFGE patterns were divided into cluster A or cluster B. **Conclusion** The closely related pandemic clone clusters of *V. cholerae* strains did exist in Shenzhen. PFGE of *V. cholerae* could be used for active surveillance and tracking for cholerae.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Pulsed-field gel electrophoresis; Molecular subtyping

霍乱作为肠道传染病, 是因摄入污染的食品(如海产品)或饮用污染的水而引起。及时监测和控制传染源, 是控制霍乱发生的关键。随着交通运输业的发展和国际贸易往来, 外来食品的增多, 疾病能以很快的速度传播。如何寻找跨区域疾病传播的传染源, 对实验室细菌分型技术提出了更高的要求。过去监测霍乱传染源时, 虽然噬菌体-生物分型技术非常有效, 但不同实验室的结果有时会出现差异, 难以比对, 需要重复。核糖体分型和随机扩增片段长度多态性分析等分型技术也存在难以在不同实验室进行比对、结果不稳定或遗传信息量小等缺陷。因此

需要采用一种可标准化、遗传信息量大、重现性好和网络化的方法来满足不同实验室的细菌分型结果比较, 以寻找跨区域疾病传播的传染源, 控制疾病的蔓延。脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术因遗传信息分辨力高^[1,2]、结果重现性好而被广泛用于传染病的分子流行病学调查和院内感染调查。本研究应用 PFGE 分析深圳市 1993 - 2002 年分离的霍乱弧菌, 旨在分析菌株之间的相关性, 同时结果分析可作为 PulseNet China 网络的一部分, 实现疾病主动监测和跨区域传染源的追踪。

材料与方 法

1. 实验用菌株: 根据深圳市 1993 - 2002 年霍乱暴发、散发、年代、区域等流行特点和菌株型别特点, 共选 60 株代表性菌株进行分型, 所有菌株都按照《霍乱防治手册》进行分离鉴定和分型。其中 O1 群菌株均为埃尔托生物型, 小川型 38 株, 主要为 2000

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300281), 国家科技攻关计划(2003BA712A05-04), 广东省卫生厅资助项目(A2003709)

作者单位: 518020 深圳市疾病预防控制中心(兰全学、扈庆华、石晓路、王冰、林一曼、张顺祥、程锦泉); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(阙飙、徐建国)

通讯作者: 扈庆华, Email: huqinghua03@163.com

年前分离;稻叶型 16 株,主要为 2000 年后分离; O139 型 6 株,为 1998 年后分离。菌株来源分为,患者标本 47 株,食品 2 株,各种环境样品 11 株。在 60 株霍乱弧菌中,6 株菌 VC2001010、VC2001011、VC2001013、VC2001014、VC2001016 和 VC2001017 为 2001 年一起霍乱暴发分离,3 株从河水中分离,其余菌株均来自于不同起霍乱。分子量参考标准菌株为沙门菌 H9812^[3]。

2. 主要仪器与试剂:脉冲场电泳仪为 Gene Path™ System(Bio-rad),凝胶成像分析软件为 Bio-rad Quantity One(4.4.0)系统。Seakem Gold 胶(Cambrex Bio Science Rockland)、蛋白酶 K(MERCK)、限制性内切酶 *Xba* I (NEB)、*Not* I (NEB) 和 *Sfi* I (NEB) 等试剂用于脉冲场凝胶电泳。

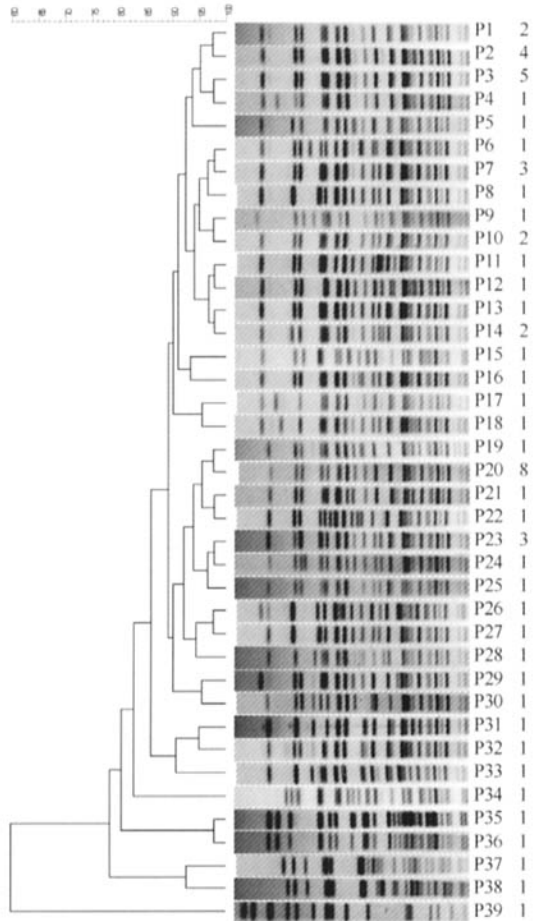
3. 方法:根据美国疾病预防控制中心推荐的 PFGE 标准方法对 60 株霍乱弧菌进行 PFGE 分型^[4],方法略有改动。①胶块的制备:菌株接种于 TSYB 肉汤培养,菌液离心后用细胞悬浮液重悬,调置菌液至一定浓度,经蛋白酶 K 消化后再加入等体积 1% Seakem Gold 胶,混匀后灌制胶块。②细胞的裂解:将胶块转入蛋白酶 K 终浓度为 0.1 mg/ml 的 5 ml 细胞裂解液中,54℃ 水浴摇床过夜。③胶块的洗涤:用 10~15 ml 50℃ 预热的纯水洗胶块 2 次,每次 15 min;再用 10~15 ml 50℃ 预热的 TE 洗胶块 4 次,每次 10 min。④DNA 的酶切:取 2 mm 宽的胶块用内切酶 *Not* I 酶切(标准菌株 H9812 用 *Xba* I 酶切)。对于 *Not* I 酶切后电泳图谱相同而血清型、噬菌体-生物型不同菌株,进一步用 *Sfi* I 酶切电泳进行区分。⑤加样及电泳:将酶切好的胶块贴在梳子齿上,向胶槽倒入 100 ml 熔化的 1% Seakem Gold 胶,待胶凝固好后进行电泳,电泳程序首先为 6.0 V/cm, 2-10 s, 120°, 13 h;其次为 6.0 V/cm, 20-25 s, 120°, 6 h。⑥图像获取及结果分析:电泳结束后,将胶块放入 EB 溶液染色,然后用纯水洗涤,在凝胶成像系统紫外灯下拍照得到电泳图谱。利用软件 BioNumerics 分析图谱,得到菌株的聚类分析树状图。

结 果

霍乱弧菌基因组 DNA 用 *Not* I 酶切后,经电泳 DNA 片段得到良好的分离,各株细菌 DNA 条带数目为 20~30。分子量最大的片段出现在约 700 kb 位

置,绝大部分菌株在 20~80 kb 出现了 10 条大小相同的片段,主要不同出现在 100~700 kb 之间的片段。

利用 BioNumerics 软件对 *Not* I 酶切电泳图谱进行聚类分析,60 株霍乱弧菌被分为 39 种 PFGE 型,各种 PFGE 型代表 DNA 片段数目和大小一致的电泳图谱,指定为 P1~P39(图 1、表 1)。大部分霍乱弧菌可被分为 A、B 两群,图 1 中 P1~P18 型,共 30 株菌为 A 群,主要为 1998、1999 年分离菌株; P19~P30 型,共 21 株为 B 群,主要为 2001 年分离菌株。



注:图右部分依次代表 PFGE 型和相应菌株数

图 1 60 株霍乱弧菌 39 种 PFGE 型聚类树状图

由表 1 可见,部分血清型或噬菌体-生物型不同而 *Not* I 酶切后电泳图谱相同,为了进一步分析这些菌株之间的关系,选取其中 20 株细菌进一步用 *Sfi* I 酶切电泳进行区分,部分菌株 *Sfi* I 酶切后能够区分(图 2)。如 *Not* I 酶切后 VC1999015 和 VC2000002 均为 P14 型,而 *Sfi* I 酶切后则显示 2 株菌存在微小差异。

表1 60株霍乱弧菌血清型、PFGE 型别、噬菌体-生物型和分离年代

菌株编号	PFGE 型 (Not I)	血清型/噬菌体-生物型	分离年代	标本来源
VC1993030	P11	埃尔托小川型 1b	1993	患者
VC1993036	P26	埃尔托小川型 1b	1993	患者
VC1994051	P27	埃尔托稻叶型 1b	1994	患者
VC1995006	P8	埃尔托小川型 1b	1995	患者
VC1997004	P17	埃尔托小川型 1b	1997	患者
VC1998006	P3	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998008	P2	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998012	P1	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998018	P12	埃尔托小川型 1b	1998	工地沟水
VC1998024	P9	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998025	P19	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998030	P3	埃尔托小川型 1b	1998	厕所棉拭
VC1998037	P13	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998040	P1	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998042	P3	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998043	P3	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998047	P21	埃尔托小川型 1d	1998	患者
VC1998051	P2	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998054	P4	埃尔托小川型 1a	1998	患者
VC1998057	P2	埃尔托小川型 1b	1998	患者
VC1998058	P34	埃尔托小川型 1a	1998	患者
VC1998103	P39	O139	1998	河水
VC1998105	P37	O139	1998	河水
VC1998397	P31	O139	1998	患者
VC1999003	P15	埃尔托小川型 3b	1999	患者
VC1999004	P32	埃尔托小川型 3b	1999	患者
VC1999005	P16	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999009	P6	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999015	P14	埃尔托小川型 1a	1999	花蛤
VC1999016	P18	埃尔托小川型 1a	1999	沙白
VC1999023	P10	埃尔托小川型 3b	1999	患者
VC1999029	P7	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999031	P35	埃尔托小川型 1d	1999	患者
VC1999036	P2	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999037	P7	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999038	P16	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999041	P7	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999042	P29	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999045	P28	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC1999046	P25	埃尔托小川型 1b	1999	患者
VC2000002	P14	埃尔托小川型 3b	2000	患者
VC2000004	P38	O139	2000	患者
VC2001001	P36	埃尔托稻叶型 15k	2001	河水
VC2001002	P23	埃尔托稻叶型 1c	2001	患者
VC2001003	P23	O139	2001	厕所
VC2001004	P33	O139	2001	患者
VC2001005	P20	埃尔托稻叶型 3f	2001	患者
VC2001010	P22	埃尔托稻叶型 1d	2001	冲凉房
VC2001011	P23	埃尔托稻叶型 1d	2001	门前沟水
VC2001013	P20	埃尔托稻叶型 1c	2001	井水
VC2001014	P20	埃尔托稻叶型 1d	2001	垃圾桶水
VC2001016	P20	埃尔托稻叶型 1d	2001	患者
VC2001017	P20	埃尔托稻叶型 1d	2001	患者
VC2001019	P10	埃尔托小川型 9k	2001	花蟹养殖水
VC2001022	P20	埃尔托稻叶型 1c	2001	患者
VC2001023	P20	埃尔托稻叶型 1d	2001	患者
VC2001024	P20	埃尔托稻叶型 1c	2001	患者
VC2001025	P30	埃尔托稻叶型 1d	2001	患者
VC2001027	P3	埃尔托稻叶型 3f	2001	患者
VC2002001	P24	埃尔托稻叶型 1d	2002	患者

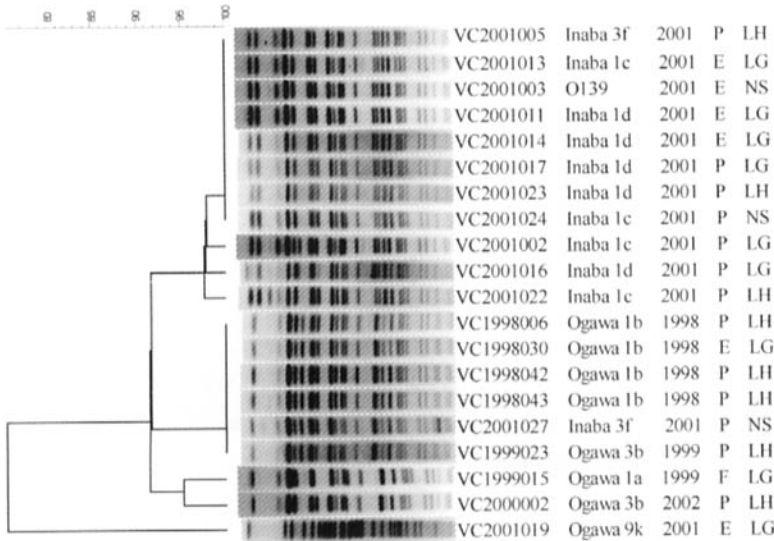
2001 年一起霍乱暴发分离的 6 株霍乱弧菌,经 *Not I* 酶切后电泳,冲凉房分离 1 株菌为 P22 型,门前沟水分离 1 株菌为 P23 型,工地井水分离 1 株菌、垃圾桶水分离 1 株菌和 2 株患者分离菌为 P20 型,各型差异不超过 3 条带,*Sfi I* 酶切电泳后图谱也只存在微小差异。从外环境中(河水)分离 3 株菌分别为 P36 型、P37 型和 P39 型,与其他菌株电泳图谱条带数目和位置差异很大。

讨 论

Not I 酶切后聚类分析结果显示,1998 年和 1999 年分离的菌株主要属 A 群,2001 年分离的菌株主要属 B 群。各群内菌株具有很强的亲缘关系,在遗传学上被认为是紧密相关菌株,可能来源于同一克隆株。聚类分析结果提示,深圳地区 1998 年和 1999 年大多数霍乱病例由一紧密相关的流行克隆群引起,2001 年大多数霍乱病例由另一紧密相关的流行克隆群引起,2001 年前后存在不同流行克隆群。另一方面,A、B 群内均存在各年分离菌株,提示 2001 年前后有部分霍乱病例之间具有较高的相关性。非 A、B 群菌株为遗传学不相关菌株,表明 1993-2002 年部分霍乱病例是无相关性的散发病例。外环境分离的 3 株细菌与霍乱分离株为遗传不相关菌株,提示了霍乱的暴发或流行与此 3 株霍乱弧菌无相关性,为了获得外环境菌株与霍乱之间的内在联系,尚需对更多的外环境菌株进行分析。

许多研究表明同起霍乱一般由单一克隆株引起^[1]。2001 年一起霍乱发生在一个建筑工地,*Not I* 酶切电泳结果显示部分菌株电泳图谱存在微小差异,可能是菌株发生单个遗传事件的结果,如点突变、插入或 DNA 缺失^[5],这些菌株应是来源于同一克隆株。当时流行病学家结合流行病学资料,建筑工人发病前曾饮用工地生井水,从而推测此起霍乱传染源是受霍乱弧菌污染的井水,在采取禁止饮用未消毒井水措施后,霍乱得到控制。现在应用 PFGE 技术进行分析,从分子水平确认霍乱弧菌污染井水引起这起霍乱暴发,PFGE 技术的应用使得传染源溯源结果更加可靠。

由于单一酶切后电泳分辨力尚有一定的局限,本研究针对部分菌株进一步用 *Sfi I* 酶切后进行区分。结合 *Not I* 和 *Sfi I* 酶切后电泳结果,存在不同血清型以及不同噬菌体-生物型电泳图谱相同的情况,其他研究中也观察到此种现象^[1,6,7],提示这



注:图右部分从左至右依次代表菌株编号、血清型/噬菌体-生物型、分离年份、分离标本来源、分离地点(P:患者,E:环境样品,F:食品,LH:罗湖区,FT:福田区,BA:宝安区, LG:龙岗区,NS:南山区)

图2 20株霍乱弧菌 Sfi I 酶切后菌株聚类树状图

些菌株是亲缘关系很近的紧密相关克隆株,可能来源于同一克隆株,血清型和噬菌体-生物型的差异也许源于非内切酶酶切位点基因变异的结果。这种现象也反映出对 PFGE 结果的解释尚需结合流行病学资料和其他分型技术^[1],仅靠 PFGE 结果进行解释尚不充分。

PFGE 方法被认为是细菌分子分型的“金标准”,为确定菌株之间的亲缘关系提供了可靠的技术手段。在欧美等发达国家,许多公共卫生实验室均有能力采用 PFGE 技术进行 DNA 指纹图谱鉴定。美国疾病预防控制中心建立的细菌分子分型国家电子网络(PulseNet),制订了标准的细菌分型 PFGE 方法,各州公共卫生实验室通过 PulseNet 的内部网络将检测结果上传至中心服务器数据库,可以快速地将来自当地患者或可疑食品的细菌 PFGE 结果与全国各地的 PFGE 结果进行比较。根据来自同一亲代的个体具有共同的遗传物质,在 PFGE 实验中表现出相同的指纹图谱的原理,确定各地致病菌的亲缘关系,追溯共同的食物致病源头^[6]。

在美国 PulseNet 建立以后,加拿大、欧洲、亚太地区和中國也相继建立了各自的 PulseNet。本研究结果为中国 PulseNet 提供了深圳地区霍乱弧菌 PFGE 指纹图谱,为实现数据共享建立良好的基础,将有助于实现霍乱疾病主动监测和传染源溯源。

参 考 文 献

[1] Kam KM, Luey CK, Tsang YM, et al. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 by pulsed-field gel electrophoresis in Hong Kong: correlation with epidemiological events from 1994 to 2002. *J Clin Microbiol*, 2003,41:4502-4511.

[2] Pichel M, Rivas M, Chinen I, et al. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J Clin Microbiol*, 2003,41:124-134.

[3] Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*, 2005,43:1045-1050.

[4] Cooper KL, Luey CK, Bird M, et al. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. *Foodborne Pathog Dis*, 2006,3: 51-58.

[5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. *J Clin Microbiol*, 1995, 33:2233-2239.

[6] Kotetishvili M, Stine OC, Chen Y, et al. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness. *J Clin Microbiol*, 2003,41:2191-2196.

[7] 毛玲玲,韩悦,徐菁,等.辽宁省1997-2002年霍乱弧菌分离株核糖体分型和脉冲场凝胶电泳分型分析. *中华流行病学杂志*, 2005,26:547.

(收稿日期:2006-08-31)

(本文编辑:王多春)