

· 实验室研究 ·

# 脉冲场凝胶电泳分型追溯江西省霍乱暴发传染源

杨梦 刁保卫 程慧健 丁晟 崔志刚 陈福辉 徐晓倩 阙斌 袁辉

**【摘要】** 目的 分析 2006 年 5 月江西省聚餐暴发霍乱疫情的分离菌株与常规监测在外环境及水产品中分离的霍乱弧菌之间分子分型特征和遗传相关性。方法 利用聚合酶链反应检测霍乱毒素基因,用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对菌株进行分子分型,所得结果以 BioNumerics V4.0 软件 UPGMA 方法进行聚类分析。结果 30 株与暴发相关分离菌株中,无论来自病例、带菌者、疫区污水、水产品的菌株均为产毒株。30 株 O139 群霍乱弧菌以 *Not I* 酶切后 PFGE 可分为 4 个型别。从甲鱼、牛蛙分离的 O139 群霍乱弧菌的型别与此次暴发的优势 PFGE 型别一致,并且也为产毒株。两起暴发包括多起聚餐,从中分离的菌株优势型别相同,传播媒介为甲鱼、牛蛙,均购于同一水产批发部,说明为同一传染源。结论 携带 O139 群霍乱毒素基因的甲鱼、牛蛙是引起本次多起聚餐暴发霍乱的主要传染源。

**【关键词】** 霍乱; 甲鱼; 脉冲场凝胶电泳

**Study on the application of pulsed-field gel electrophoresis regarding infection sources identification during an outbreak of *Vibrio cholerae* in Jiangxi province** YANG Meng\*, DIAO Bao-wei, CHENG Hui-jian, DING Sheng, CUI Zhi-gang, CHEN Fu-hui, XU Xiao-qian, KAN Biao, YUAN Hui. \*Jiangxi Center for Disease Control and Previntion, Nanchang 330029, China  
Corresponding author: YUAN Hui, Email: yuanhui@jxcdc.net

**【Abstract】 Objective** To study the correlation between *Vibrio cholerae* strains isolated from natural environment and fishery products and the source of infection during *V. cholerae* outbreaks. **Methods** Cholera toxin gene was detected by polymerase chain reaction (PCR) amplification. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to subtype the isolates. Results of PFGE were analyzed and clustered by BioNumerics software (Version 4.0). **Results** During the outbreaks, a total number of thirty O139 *V. cholerae* related serogroups were collected from patients, carriers, sewage and fishery products were identified and proved to be toxigenic. They could be clustered into four PFGE patterns when digested by *Not I*. These two *V. cholerae* outbreaks were caused by the same source of infection because of the following reasons: (1) PFGE patterns of the predominant strains isolated from two outbreaks were identical; (2) they were identical to the PFGE patterns of the strains isolated from the green turtle and rana catesbiana which were bought from the same wholesale store. **Conclusion** Green turtle and rana catesbiana that were contaminated by toxigenic O139 *V. cholerae* strains seemed to be the source of infection causing the O139 *V. cholerae* outbreaks in Jiangxi province. Rapid laboratory surveillance and epidemiologic investigation were important in identifying the source of infection during the outbreaks of *V. cholera*.

**【Key words】** Cholera; Green turtle; Pulsed-field gel electrophoresis

脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型是用于对细菌菌株进行分子指纹图谱分型的技术,在基因组水平上对细菌的变异特征进行分析,已经广泛应用于分析不同来源菌株是相关的暴发还是无关联的散发<sup>[1]</sup>。为了分析霍乱暴发时环境与食品监测菌株的特征

以及是否存在关联,本研究对 2006 年江西部分地区出现霍乱疫情中不同来源菌株进行了分子流行病学研究。

## 材料与方 法

1. 实验用菌株:病例为江西省樟树市和新余市 14 起聚餐引起的霍乱疫情,2006 年 5 月 2 日发生首例病例,菌型为 O139 群霍乱弧菌。两地暴发疫情均由聚餐引起,病例及带菌者均有聚餐史,病例主要

作者单位:330029 南昌,江西省疾病预防控制中心(杨梦、程慧健、丁晟、陈福辉、徐晓倩、袁辉);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(刁保卫、崔志刚、阙斌)  
杨梦与刁保卫同为第一作者  
通讯作者:袁辉,Email: yuanhui@jxcdc.net

集中在樟树市、新余市渝水区,其他地区的病例和带菌者均因到樟树市和新余市聚餐引起。30 株受试菌株为两地区两起霍乱疫情处理和外环境监测分离所得;其中患者 12 株、带菌者 9 株、甲鱼 3 株、牛蛙 4 株、疫区污水 1 株、砧板 1 株(表 1)。所有菌株经江西省疾病预防控制中心传染病防制所细菌实验室鉴定为霍乱弧菌 O139 群。作为分子量标准(Marker)的沙门菌 H9812 由全国病原细菌实验室监测网络 PulseNet China(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所组织)提供。

表1 江西省两起疫情中 O139 群霍乱弧菌相关分离株

编号	地点	来源	毒素基因	PFGE 分型
Jx06004	樟树市	暴发 1 相关	+	2
Jx06006	樟树市	暴发 1 相关	+	4
Jx06007	樟树市	暴发 1 相关	+	1
Jx06018	樟树市	暴发 1 相关(砧板)	+	4
Jx06030	樟树市	暴发 1 相关	+	4
Jx06035	樟树市	暴发 1 相关	+	2
Jx06060	樟树市	暴发 1 相关	+	3
Jx06064	樟树市	暴发 1 相关	+	4
Jx06066	樟树市	暴发 1 相关	+	4
Jx06070	南昌市	暴发 1 相关	+	4
Jx06019	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06025	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06026	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06027	樟树市	暴发 1	+	3
Jx06029	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06031	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06032	樟树市	暴发 1	+	1
Jx06033	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06034	樟树市	暴发 1	+	4
Jx06017	樟树市	常规监测(池塘水)	+	4
Jx06020	樟树市	常规监测(牛蛙)	+	4
Jx06045	樟树市	常规监测(甲鱼)	+	4
Jx06050	渝水区	常规监测(牛蛙)	+	4
Jx06051	渝水区	常规监测(甲鱼)	+	4
Jx06053	渝水区	常规监测(牛蛙)	+	4
Jx06054	渝水区	常规监测(牛蛙)	+	4
Jx06068	南昌市	常规监测(甲鱼)	+	2
Jx06048	渝水区	暴发 2	+	4
Jx06049	渝水区	暴发 2	+	4
Jx06052	渝水区	暴发 2	+	4

注:“暴发 1 相关”为樟树市暴发点的带菌者和 1 株砧板分离株(Jx06018)

2. 检测方法:

(1)PCR 检测霍乱毒素基因 *ctxAB*:PCR 相关试剂为 TaKaRa(大连)产品。霍乱毒素基因 *ctxAB* 的扩增引物序列参照文献[2],序列分别为 5'- ATT TTG AGG TGT TCC ATG TG -3'和 5'- ATA AAG CAG TCA GGT GGT CT-3',阳性对照为产毒菌株 N16961,PCR 产物预期长度为 749 bp。PCR 反应体系为 20 μl,即 dNTP 3.2 μl,10× buffer (Mg<sup>++</sup>) 2 μl,上引物 0.4 μl,下引物 0.4 μl,Taq 酶 0.2 μl,DNA 模板 0.5 μl,水 13.3 μl。扩增参数为:预变性

94℃ 5 min,后续 94℃ 30 s,55℃ 40 s,72℃ 60 s,进行 30 个循环,末轮循环 72℃ 10 min。

(2)PCR DNA 模板的制备方法:为水煮法。取 1~2 个单菌株于 100 μl 灭菌的去离子水中,混匀,于 100℃ 煮沸 20 min,然后冰浴 5 min,离心 12 000 r/min 3 min,取上清液作为 PCR 扩增的模板,置 4℃ 冰箱备用。

(3)PFGE 实验:参照美国疾病预防控制中心 PulseNet 标准实验方案。①DNA 胶块制备:取适量新鲜待检菌株均匀悬浊于 1 ml 细胞悬浊液(100 mmol/L Tris-HCl:100 mmol/L EDTA, pH 值 8.0)中,调整浓度,使其吸光度(A)值为 4.2 左右。取 400 μl 菌悬液 37℃ 孵育 5 min,每管加入 20 μl 蛋白酶 K 至终浓度 0.5 mg/ml,再与等体积琼脂糖凝胶(含 1% SDS,56℃)混合,倒入模具,于室温下凝固 10-15 min。把胶块放入试管中,每管加入 5 ml 蛋白酶 K/细胞裂解液混合液。54℃ 水浴轻摇 2 h。弃溶液,用 50℃ 预热的灭菌纯水洗胶块 2 次,每次摇 15 min(50℃)。倒掉水,再用 50℃ 预热的 TE 洗胶块 4 次,每次摇 15 min(50℃)。②酶切(胶内酶切):切取 2 mm 宽制备好的 DNA 胶块浸入 200 μl 酶切缓冲液中,37℃ 缓冲 10-15 min,吸出酶切缓冲液,再加入 200 μl 含有 30 U 的 *NotI* 酶切缓冲液,37℃ 酶切 2 h。沙门菌 H9812 染色体 DNA 用 *XbaI* 酶切,其余实验方法与受试菌株相同。③电泳:PFGE 系统为 Bio-Rad 公司 CHEF DR III 型,电泳电压 6 V,夹角 120°,脉冲时间 2-10 s,13 h;20-25 s,6 h。获得的电泳图像以 BioNumerics 数据库软件进行分型分析。

结 果

1. PCR 检测霍乱毒素基因 *ctxAB*:从调查暴发的病例、具有共同聚餐史的带菌者、常规环境和水产品监测中分离的 30 株 O139 群霍乱弧菌,经 PCR 扩增能在 749 bp 处扩增出一条带,*ctxAB* 检测阳性,说明是产毒的 O139 菌株引起了此次暴发(表 1),同时从水产品监测中分离到产毒的 O139 群霍乱菌株,提示这些水产品作为传染源的危险性。

2. PFGE 分析:根据 BioNumerics 对 PFGE 带型的识别,对 30 株受试菌进行相似性比较,这些菌株可分为 4 种带型(表 1 和图 1)。两起暴发中的分离菌株 PFGE 分型分析结果显示,引起暴发的为单一菌型,并且与病例有共同聚餐史的带菌者分离株同病例菌株带型相同(4 型),均为产毒株,提示这些暴

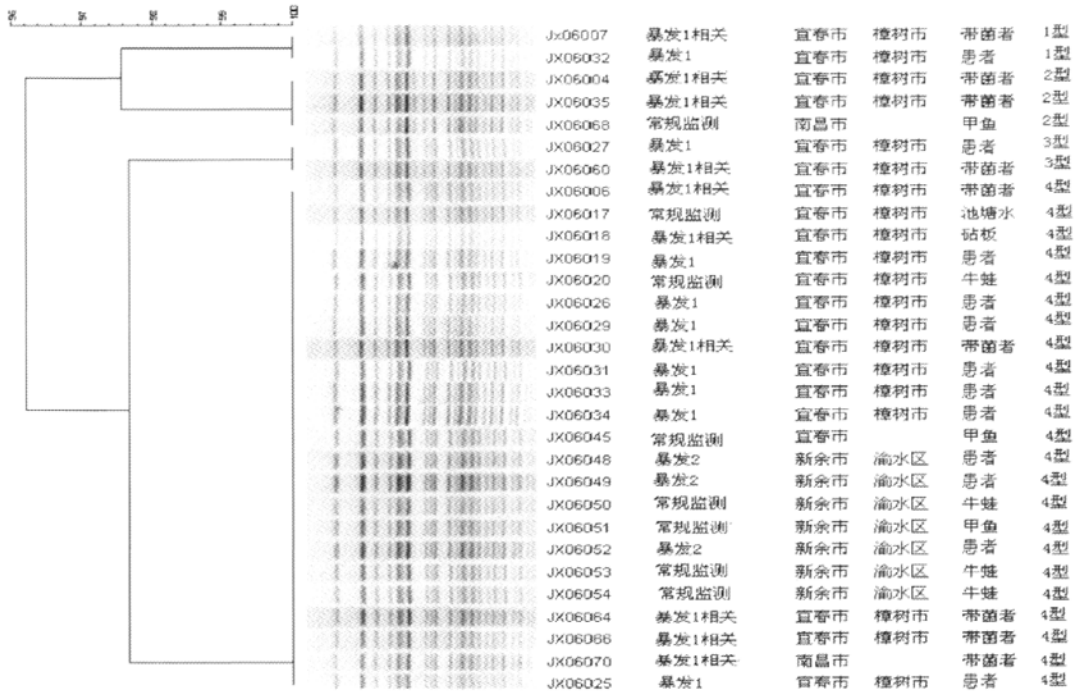


图1 江西省两起霍乱暴发中 O139 群霍乱弧菌分离株的 PFGE 相似性聚类分析

发之间可能有共同的污染来源。

3. 传染来源:新余市、樟树市自水产品牛蛙和甲鱼中分离的 O139 霍乱菌株为产毒株,PFGE 带型与病例和带菌者的相同(4 型);而流行病学调查发现聚餐中加工食用了牛蛙和甲鱼,调查采样的销售点与聚餐购买的销售点相同,调查采样分离出 O139 霍乱弧菌产毒,而 PFGE 分型也与暴发的菌株相同;另外,在一饭店聚餐时使用的砧板上分离到产毒 O139 菌株(4 型),说明污染牛蛙和甲鱼是这些暴发的感染来源,加工期间的交叉污染导致了聚餐暴发。暴发中的病例菌株和水产品中分离株带型一致和型别单一,这些携带产毒株的甲鱼和牛蛙均来自一个水产批发部,说明销售的牛蛙和甲鱼受到广泛的污染。

4. 外环境检索:在宜春樟树市聚餐暴发点患者家里附近的池塘水中检出产毒 O139 霍乱菌株,且 PFGE 带型与病例的菌型相同(4 型),说明存在着环境水体的污染。

5. PFGE 1~4 型的比较:本项调查中,有个别病例和带菌者的菌株出现新的带型(1~3 型),可能是菌株在传播中存在微小变异,因为这些带型之间的相似性很高,但也不排除存在另外的感染途径。PFGE 1~4 型的不同之处在于:1 型和 2 型的区别是 138.9~104.5 kb 之间,2 型多了一条带;2 型和 3 型的

区别是 104.5~79 kb 之间,3 型多了一条带;3 型和 4 型的区别是 138.9~104.5 kb 之间,4 型少了一条带;2 型和 4 型的区别是 138.9~104.5 kb 之间的一条带移位至 104.5~79 kb 之间(图 2)。2 型中带菌者与水产品常规监测南昌市甲鱼(产毒株)分离株 PFGE 带型相同,而此带型(2 型)与这些暴发中的病例以及新余市水产批发部的调查样品带型(4 型)不同,据流行病学调查这两个地点的甲鱼来源不同。

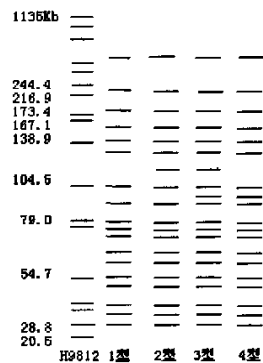


图2 江西省两起霍乱分离株 PFGE 1~4 型示意图

6. 与往年 O139 群霍乱弧菌产毒株 PFGE 带型的比较:比较分析江西省 2004、2005、2006 年暴发 O139 群菌株的 PFGE 带型(图 3),2006 年聚餐霍乱暴发的优势菌型不同于往年,不是以往的延续。但

是,2006 年 PFGE 2 型与 2004、2005 年分离的带型相同,是否有其他的变异在本实验条件下没有检测到,还需要进一步深入分析。

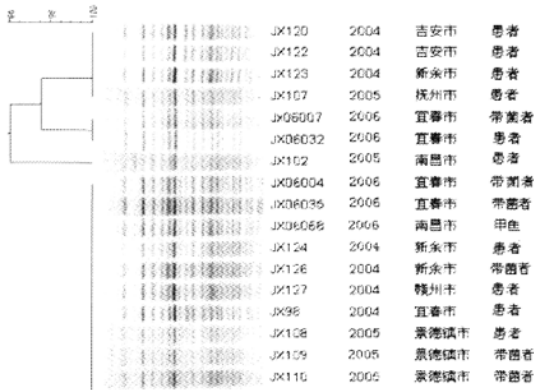


图3 江西省两起霍乱与2004、2005年O139群暴发分离株的PFGE带型比较

## 讨论

在霍乱的预防控制中,需要明确感染的来源和暴发的危险因素,寻找传播途径和分析流行规律,以便采取针对性的防治措施。但在霍乱暴发或流行中,疫情多呈现“来无影,去无踪”的特点,难以明确传染来源。近年来,基于核酸水平的分子生物学方法在病原体分析中的应用,可以从分子水平研究暴发中致病微生物之间的相关性,分析散发与散发、散发与暴发以及不同暴发之间的联系,查找传染来源,以阻断传播链。

此次疫情病例发病与其聚餐相隔时间段均在一个常见潜伏期内。聚餐中均有甲鱼和/或牛蛙,调查采样的销售点与聚餐购买的销售点相同,且从同一批次的甲鱼、牛蛙中检出O139群霍乱弧菌产毒株,PFGE带型与病例和带菌者分离株带型一致。现场卫生监督发现举办酒宴聚餐的酒店、家庭,餐具清洁消毒均不严格、厨具生熟不分;从樟树市聚餐点宴席主人家的砧板表面涂抹标本中检出与暴发菌株相同的产毒O139群霍乱弧菌;自从停止销售甲鱼、牛蛙后,未出现新的暴发点,在当地居民、生活饮用水及其水源监测中未发现阳性。可以推断,这些疫情是一起同源多次暴露的食源性霍乱暴发,污染的甲鱼和牛蛙是感染来源,食物制作过程中的交叉污染引起了疫情的发生。

2006年的聚餐霍乱暴发中个别菌株出现新的带型(1、2、3型)。我们分析可能是污染来源复杂,

不能排除多种污染食品或同种食品多种污染的可能。如2型中南昌的甲鱼分离株亦为产毒株,带型与这些暴发中病例菌株主要带型以及新余水产批发部的调查样品带型不同,这两个地点的甲鱼来源也不同,提示南昌甲鱼分离株与本次暴发无关联。但还不能确定这些暴发中使用的甲鱼等水产品中是否还有其他带型的O139群菌株,或许还有其他菌株感染了少部分的病例和带菌者(菌株PFGE分型中1~3型的感染者),这些菌株在我们对暴发涉及的水产品的调查中没有分离到。另外,也有可能是菌株的变异引起;已知霍乱弧菌一些表型容易变异<sup>[3,4]</sup>。对于2006年少量的暴发相关菌株与2004、2005年分离的带型相同;可能的解释,一是此类菌株延续几年存在,二是2006年暴发菌株中个别菌株(PFGE 2型的菌株)变异而造成了带型与往年的相同,但很可能存在更细致的差异,通过本研究中的PFGE条件没有鉴别出来。因为不可能追踪自然界中这类菌株的存在和延续,所以还不能定论。

在暴发相关的环境水体监测中发现存在污染。从樟树市洲上池塘水中检出产毒O139群霍乱菌株,并且与病例的菌型相同,流行病学调查发现,病例曾将排泄物倒入该水塘。因此应注意病例的隔离和排泄物的消毒,否则污染当地池塘水体后难以消除,可能会在当地环境水体中定殖。

通过本次对暴发的调查与监测,将多次不相关的聚餐感染的疫情联系了起来,证实为共同传染源的暴发;均加工食用了同一销售点同批次来源的水产品而引起,明确了传播来源,有利于确定具体的控制措施。监测提示,当前O139霍乱的聚餐暴发中,水产品污染仍是防制的重点,应加强对餐饮加工行业的重点监测,提出明确的卫生指导建议;尤其注意生熟分开以及严格的消毒。另外,需注意病例和带菌者排菌对环境的污染,可能会造成暴发或流行的延续。

## 参考文献

- [1] 周晓明,卢林耿,卫国荣,等.脉冲场电泳进行E. coli O157的分型.复旦大学报(医学科学版),2001,28:71-72.
- [2] 刘广文,闫梅英,祁国明,等.霍乱弧菌溶原性噬菌体CTXΦ的氯霉素抗性基因标记及诱导.中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(4):253-257.
- [3] 刘红露,冯泽惠,尹致英,等.四川省O1群霍乱弧菌突变株的鉴定分析.预防医学情报杂志,2004,20(3):321-323.
- [4] Dalsgaard A, Skov MN, Serichantalergs O, et al. Molecular evolution of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Lima, Peru, from 1991 to 1995. J Clin Microbiol, 1997, 35(5):1151-1156.

(收稿日期:2007-01-25)

(本文编辑:尹廉)