

· 实验室研究 ·

# 非 O1/非 O139 群霍乱弧菌感染病例 分离株分子流行病学分析

陈道利 张萍 王多春 陈谨 喻佰启 程险峰 刁保卫 周海健 朱明  
胡万富 詹圣伟 景怀琦 阙斌

**【摘要】** 目的 分析安徽省马鞍山市连续 2 个月内监测到的 6 例具有霍乱疑似症状、感染非 O1/非 O139 群霍乱弧菌的病例,判断疫情的聚集性。方法 对病例分离株进行生化和血清型别鉴定以及溶血试验,药敏试验检测抗生素耐药谱,应用荧光 PCR 和常规 PCR 进行霍乱弧菌特异基因、毒力及其相关基因的检测,包括 *ompW*、*ctx*、*tcpA*、*toxR*、*hlyA*、*zot*、*ace*、*rstR* 和 *gIII<sup>CTX</sup>*,应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析其分子型别。结果 生化鉴定和血清学试验鉴别腹泻病例 6 株菌株为非 O1/非 O139 霍乱弧菌,均产生  $\beta$  溶血;14 种药物中有 12 种属于全部敏感;荧光 PCR 检测霍乱弧菌特异性基因 *ompW* 均为阳性,*ctx*、*tcpA*、*zot*、*ace*、*rstR* 和 *gIII<sup>CTX</sup>* 基因均为阴性,*toxR*、*hlyA* 基因有 5 株菌扩增阳性,1 株菌(1001434446)为阴性;PFGE 显示 6 株菌带型均不相同,但有 2 株非常相似,分离株与霍乱弧菌产毒株相似性很低。结论 6 例感染非产毒的非 O1/非 O139 群霍乱弧菌病例发病虽相对集中,但属于散发病例,在局部地区频繁出现,提示其公共卫生意义不可忽视。

**【关键词】** 霍乱弧菌,非 O1/非 O139; 荧光 PCR; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳

**Molecular analysis on non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* isolates** CHEN Dao-li<sup>1</sup>, ZHANG Ping<sup>2</sup>, WANG Duo-chun<sup>2</sup>, CHEN Jin<sup>1</sup>, YU Bai-qi<sup>3</sup>, CHENG Xian-feng<sup>1</sup>, DIAO Bao-wei<sup>2</sup>, ZHOU Hai-jian<sup>2</sup>, ZHU Ming<sup>1</sup>, HU Wan-fu<sup>1</sup>, ZHAN Sheng-wei<sup>1</sup>, JING Huai-qi<sup>2</sup>, KAN Biao<sup>2</sup>. 1 Maanshan City Center for Disease Control and Prevention, Maanshan 243000, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and prevention, State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control; 3 Clinical Laboratory Center of Maanshan City Medical Group; 4 Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author; KAN Biao, Email: kanbiao@icdc.cn  
This work was supported by a grant from the Priority Project on Infectious Disease Control and Prevention (No. 2009ZX10004-203).

**【Abstract】** **Objective** According to results from the two-month consecutive surveillance program in Maanshan, six suspected cases of non-O1 non-O139 *Vibrio (V.) cholerae* infection, were found that called for identification of pathogens as well as molecular-epidemiological analysis to determine the aggregation of the epidemic situation. **Methods** Biochemical and serotype identification, hemolysis test, and drug sensitive test were used to detect the drug resistance spectrum. Real-time PCR and conventional PCR were used to detect the presence of *V. cholerae* specific genes, virulent genes and its related genes, including *ompW*, *ctx*, *tcpA*, *toxR*, *hlyA*, *zot*, *ace*, *rstR* and *gIII<sup>CTX</sup>*. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used to analyze the molecular type of strains. **Results** All the six isolates of non-O1 non-O139 *V. cholerae* were identified by biochemical and serologic tests, and appeared to be  $\beta$  hemolytic. Twelve out of the 14 kinds of drugs showed 100% sensitive. All isolates were positive of *ompW* gene by real-time PCR, but negative for *ctx*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *rstR* and *gIII<sup>CTX</sup>*. Five of the six isolates were positive for *toxR* and *hlyA*, except for strain 1001434446. All strains had different PFGE types, but two strains had similar types. All strains had a low similarity compared to the toxigenic *V. cholerae*. **Conclusion** Six cases of non-O1 and non-O139 nontoxigenic

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.015

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX10004-203)

作者单位: 243000 安徽省马鞍山市疾病预防控制中心(陈道利、陈谨、程险峰、朱明、詹圣伟); 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(张萍、王多春、刁保卫、周海健、景怀琦、阙斌); 安徽省马鞍山市医疗集团临床检验中心(喻佰启); 安徽省疾病预防控制中心(胡万富)

陈道利、张萍同为第一作者

通信作者: 阙斌, Email: kanbiao@icdc.cn

*V. cholerae* infection appeared in the same period. Along with epidemiological information, we noticed that these cases had a sporadic nature, but frequently appeared in the same area. We got the impression that public health measurements should be strengthened, with special attention paid to those diarrhea outbreaks caused by non-O1/non-O139 strains since *V. cholerae* had appeared in low incidence.

【Key words】 *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139; Real-time PCR; Virulence gene; Pulsed-field gel electrophoresis

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)依据O抗原的不同,目前已划分为206个血清群<sup>[1]</sup>,但引起人群流行的只有产生霍乱毒素(CT)和毒力协同调节菌毛(TCP)的O1群和O139群菌株<sup>[2]</sup>。非产毒O1/O139血清群霍乱弧菌以及非O1/非O139血清群霍乱弧菌不致病或偶然引起轻度腹泻,也偶致肠道外感染,主要表现为散在发生;但也有报道<sup>[3-6]</sup>,其中部分菌株可造成局部暴发。2010年8—9月在安徽省马鞍山市连续监测的6例疑似霍乱腹泻病例中分离出非O1/非O139群霍乱弧菌,由于病例相对集中出现,是否存在偶然的聚集还是暴发,为此对分离菌株进行了霍乱弧菌生物学特性、相关毒力基因检测以及分子分型研究,以分析可能发生的非O1/非O139群霍乱弧菌导致的疫情。

### 材料与方法

1. 菌株:6株测试菌均来自2010年8—9月马鞍山市综合性医院肠道门诊6例腹泻患者(2例男性,4例女性;年龄30~66岁)粪便标本。阳性对照株选择N16961(O1群霍乱弧菌)、MO45(O139群霍乱弧菌)。

2. 菌株生化鉴定及药敏试验:将TCBS平板上生长为黄色、光滑、湿润、中等大小可疑菌落接种KIA斜面,经培养KIA斜面生长为—/+H<sub>2</sub>S—;分离培养纯菌株,氧化酶阳性。使用法国生物梅里埃全自动微生物鉴定VITEK32系统GNI<sup>+</sup>鉴定卡进行系统生化分析,同时用GNS448药敏卡进行药敏试验。TCBS琼脂购自美国BD公司,KIA培养基购自英国OXIOD公司,GNI<sup>+</sup>鉴定卡及GNS448药敏卡购自法国生物梅里埃公司,均在有效期内使用。

3. 溶血试验:6株疑似菌株经营养肉汤纯培养,挑满环培养液点种脱纤维羊血琼脂平板,36℃培养过夜,观察血平板细菌生长情况。营养肉汤培养基购自英国OXIOD公司,脱纤维羊血琼脂平板为本市临检中心实验室新鲜配制提供。

4. 菌株血清群鉴定:使用O1、O139群诊断血清分别对6株可疑菌株进行玻片法凝集试验,同时用无菌生理盐水作对照。O1、O139群诊断血清购自郑州万泰生物科技有限公司,有效期内使用。

5. 荧光PCR扩增特异基因:霍乱弧菌的外膜蛋白表达基因(*ompW*)被用作种特异性基因。设计扩增引物序列为*ompW*(F)TTG CTG CTA ACG TTG GCT TTG;*ompW*(R)CTG CTT TGT AGG TTG CCG TTG,扩增产物为102 bp。荧光PCR条件预变性95℃,3 min;95℃,10 s;58℃,30 s,40个循环。荧光PCR体系25 μl,SYBRmix 12.5 μl;上下游引物各1 μl;H<sub>2</sub>O 9 μl;DNA模板1.5 μl。同时以N16961(O1)、MO45(O139)和菌株2008143(非O1/O139)为阳性对照,纯水作阴性对照。测定产物熔解曲线以协助判定扩增特异性。荧光试剂SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup>购自TaKaRa公司,荧光PCR仪使用CFX96(美国Bio-Rad公司)。

6. 毒力基因检测:针对O1、O139群霍乱弧菌的毒力基因首选*ctx*、*tcpA*、*zot*三个主要毒力基因及*rstR*和*gIII<sup>ctx</sup>*两个毒力相关基因进行PCR检测;同时选择霍乱弧菌致病相关因子参照文献[4,7]合成*toxR*、*hlyA*、*ace*三种毒力相关基因引物(表1)。步骤:①模板制备:按照QIAGEN DNA提取试剂盒操作说明提取6株测试菌的DNA作为PCR模板,-20℃备用;②扩增检测基因PCR扩增条件见表1;PCR体系采用50 μl体系,即2×Easy Taq PCR mix 25 μl;上下游引物各1.5 μl;纯水20 μl;DNA模板2 μl,PCR扩增试剂2×Taq PCR Master mix,购自TIANGEN公司,扩增仪使用Labcyler Triple(德国Sensoquest公司);③电泳及成像:扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶100 V 45~60 min电泳,在凝胶成像仪中观察并拍照。

7. 菌株分子分型:6株测试菌的分型参照国际致病菌分子分型实验室监测网络PulseNet International制订的“霍乱弧菌脉冲场凝胶电泳(PFGE)标准操作方案”进行。DNA分子量标准为沙门菌H9812;完成PFGE图谱,输入中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络PulseNet China中心数据库进行比对。

### 结 果

1. 生化及血清学鉴定:6株疑似菌株经VITEK32系统生化鉴定报告为霍乱弧菌,鉴定值均达到99%;O1、O139群诊断血清凝集试验均为阴性;

表1 5种毒力基因引物序列、产物长度及扩增条件

引物名称	引物序列(5' ~ 3')	产物长度(bp)	扩增条件
<i>ctx-F</i>	TTG CGG CAA TCG CAT GAG GC	526	94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s; 58 ℃, 45 s, 72 ℃, 45 s; 30个循环, 72 ℃, 7 min
<i>ctx-R</i>	CGC CGG GTT GTG GGA ATG CT		
<i>rstR-F</i>	ACA CTC ACC TTG TAT TCG	865	94 ℃, 10 min; 94 ℃, 30 s; 58 ℃, 45 s; 72 ℃, 1 min; 30个循环, 72 ℃, 10 min
<i>rstR-R</i>	TCG ACA TCA AAT GGC ATG		
<i>gIII<sup>ctx</sup>-F</i>	ATG CGC TAT TTT CTA CTG TTT TTG AC	1188	94 ℃, 10 min; 94 ℃, 30 s; 56 ℃, 45 s; 72 ℃, 1 min; 30个循环, 72 ℃, 10 min
<i>gIII<sup>ctx</sup>-R</i>	TCA CCT AAA CAA AAT GAG CAT GGC GG		
<i>zot-F</i>	GGA TTT GGT CGC AGA GGA TA	1185	94 ℃, 10 min; 94 ℃, 30 s; 56 ℃, 45 s; 72 ℃, 1 min; 30个循环, 72 ℃, 10 min
<i>zot-R</i>	GCA TCA TTT CCC CCT GTA AA		
<i>tcpA-F</i>	TGCTGTCCGTGTCGCACCAG	400	94 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s; 56 ℃, 45 s; 72 ℃, 45 s; 30个循环, 72 ℃, 7 min
<i>tcpA-R</i>	CGGCAGAGGCCAAAATCGCCT		
<i>toxR-F</i>	CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C'	779	94 ℃, 5 min; 94 ℃, 60 s; 60 ℃, 60 s; 72 ℃, 1 min; 30个循环, 72 ℃, 10 min
<i>toxR-R</i>	AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G'		
<i>hlyA-F</i>	GGC AAA CAG CGA AAC AAA TAC C	738	94 ℃, 5 min; 94 ℃, 60 s; 60 ℃, 60 s; 72 ℃, 1 min; 30个循环, 72 ℃, 10 min
<i>hlyA-R</i>	CTC AGC GGG CTA ATA CGG TTT		
<i>ace-F</i>	GCT TAT GAT GGA CAC CCT TTA	284	94 ℃, 5 min; 94 ℃, 90 s; 55 ℃, 90 s; 72 ℃, 1 min; 30个循环, 72 ℃, 10 min
<i>ace-R</i>	TTT GCC CTG CGA GCG TTA AAC		

注: *toxR*、*hlyA* 两对引物的扩增条件根据文献略做调整

通过PCR检测O1群和O139群特异性基因进行复核, 结果为阴性, 6株菌鉴定为非O1/非O139群霍乱弧菌。

2. 溶血试验: 6株测试菌在血平板上生长良好, 除1001434446菌株只有微弱溶血环外, 其余5株菌菌落周围均出现明显的β溶血环, 溶血试验阳性。

3. *ompW*基因检测: SYBR Green 荧光PCR检测霍乱弧菌种特异性基因*ompW*, 结果显示6株测试菌株与阳性对照菌株有相同的溶解曲线值, 连同生化和血清学鉴定, 说明这6株菌均为霍乱弧菌(图1)。

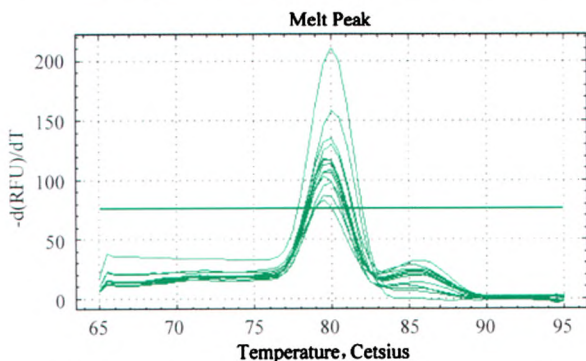


图1 6株疑似霍乱弧菌株及对照株荧光PCR溶解曲线

4. 毒力和毒力相关基因检测: 首先用 *ctx*、*zot*、*tcpA*、*rstR* 和 *gIII<sup>ctx</sup>* 五对引物对6株测试菌进行PCR扩增, 结果均为阴性。再对6株测试菌是否携带霍乱弧菌致病相关基因进行PCR检测, 结果除菌株1001434446外, 5株测试菌均携带 *toxR*、*hlyA* 致病基因。6株测试菌 *ace* 基因均阴性(表2)。

5. 药敏试验: 6株测试菌对阿米卡星、氨苄西林、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、头孢噻肟、头孢他

表2 6株非O1/非O139毒力基因检测结果

菌株号	毒力基因							
	<i>ctx</i>	<i>tcpA</i>	<i>zot</i>	<i>rstR</i>	<i>gIII<sup>ctx</sup></i>	<i>toxR</i>	<i>hlyA</i>	<i>ace</i>
1001432655	-	-	-	-	-	+	+	-
1001434230	-	-	-	-	-	+	+	-
1001434446	-	-	-	-	-	-	-	-
2010-1	-	-	-	-	-	+	+	-
2010-2	-	-	-	-	-	+	+	-
2010-3	-	-	-	-	-	+	+	-
N16961	+	+	+	+	+	+	+	+
MO45	+	+	+	+	+	+	+	+

注: + 阳性, - 阴性

啉、头孢呋辛、庆大霉素、亚胺培南、左氧氟沙星、美洛培南、哌拉西林/三唑巴坦全部敏感; 对头孢唑啉1株耐药, 1株敏感, 4株中介; 对头孢西丁有3株敏感, 3株中介。14种药物中有12种药物敏感, 药物敏感率达到85.7%, 对庆大霉素6株菌全部敏感。

6. PFGE分型: 6株非O1/非O139群霍乱弧菌无完全相同的带型。在PulseNet China中心数据库中搜索近年安徽省内及周边省分离记录入数据库的O1和O139群霍乱弧菌暴发株和患者分离株PFGE带型比对, 相似度均很低。但从图2中看出菌株1001434230和2010-1带型非常相似, 相似度高达97%以上。

### 讨论

目前报道的致腹泻非O1/非O139群霍乱弧菌中, 有些菌株致病因子与O1群或者O139群霍乱弧菌相似<sup>[6]</sup>, 因此可认为非O1/非O139群霍乱弧菌也有可能偶然情况下, 通过基因水平转移获得TCP

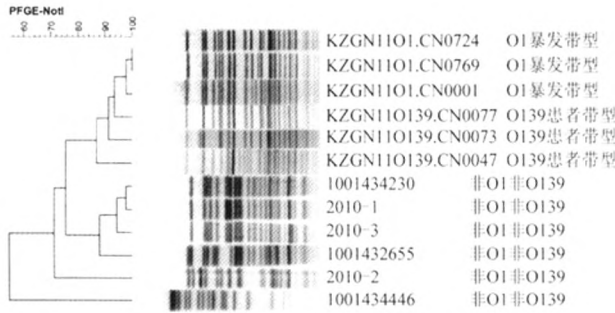


图2 6株非O1/非O139霍乱弧菌与参照菌株的PFGE图谱

和CT这两种毒力而成为产毒株。但这种情况很少见,大多数分离自患者的非O1/非O139群菌株不携带TCP、CT等致病因子的基因簇,致病机制难以解释。目前在一株致腹泻但不产霍乱毒素的非O1/非O139群菌株中,发现Ⅲ型分泌系统在致肠道黏膜病理改变以及致腹泻中的重要作用<sup>[8]</sup>。与产毒霍乱弧菌导致的腹泻有不同,该菌导致肠黏膜明显的病理损伤,提示不产毒素的菌株存在其他致病机制。

对非O1/非O139群霍乱菌株,需先检测是否产生霍乱毒素以及其他常见肠毒素等。本研究中6株菌均不具有霍乱毒素基因以及携带霍乱毒素基因的噬菌体CTX $\Phi$ 基因组基因,也不携带合成毒素共调菌毛的基因,说明这6株菌不具有引起霍乱的典型毒力基础。另外,有5株菌株具有*toxR*和*hlyA*毒力和相关基因,这与国内报道基本一致<sup>[9,10]</sup>。

近年有报道在临床患者的透析液中检出1株对第三代头孢菌素耐药的非O1/非O139群霍乱弧菌,并产PER-1超广谱 $\beta$ 内酰胺酶ESBL<sup>[11]</sup>。本研究6株非O1/非O139群霍乱弧菌对14种药物多数敏感,未出现严重的耐药菌株,药敏谱与国内相关报道一致<sup>[9]</sup>。

研究中将分离的6株菌与安徽省内外自2005年起分离的O1群和O139群霍乱弧菌进行PFGE图谱比对,显示菌株间差异较大,且本文的6株非O1/非O139群菌株间也不相同,仅2株相似。提示这些病例感染来源可能存在差异。

目前不产霍乱毒素的非O1/非O139群霍乱弧菌以及O1群菌株引起腹泻的报道已非罕见,显然除霍乱毒素外还有其他致病因子。针对这类病原菌,需要在致病机制上开展更多的研究,并加强对其检测和监测。

参 考 文 献

[1] Xu JG, Kan B, Zhang JZ, et al. Site Bacteriology. Beijing: Science Press, 2011:7-8. (in Chinese)  
徐建国, 阙枫, 张建中, 等. 现场细菌学. 北京: 科学出版社,

2011:7-8.  
[2] Rui YY, Xu RH, Kan B, et al. Sequence analysis of important toxic genes and housekeeping genes of *Vibrio cholerae* strains isolated from Guangdong province. Chin J Public Health, 2006, 22(1):31-33. (in Chinese)  
芮勇宇, 许锐恒, 阙枫, 等. 霍乱弧菌主要毒力和管家基因序列分析. 中国公共卫生, 2006, 22(1):31-33.  
[3] Lin RW, Ye JL, Luo Y, et al. Molecular biological source analysis of the initial *Vibrio cholerae* non-O1 food poisoning in Lishui city. Dis Surv, 2007, 22(9):582-584. (in Chinese)  
林仁卫, 叶菊莲, 罗芸, 等. 浙江省丽水市首起非O1群霍乱弧菌食物中毒分子生物学溯源分析. 疾病监测, 2007, 22(9):582-584.  
[4] Xu JY, Lin C, Shen XY, et al. Laboratory identification of a food-poisoning event caused by *Vibrio cholerae* non-O1. Dis Surv, 2007, 22(6):368-369, 380. (in Chinese)  
徐景野, 林朝, 沈玄艺, 等. 一起引起食物中毒的非O1群霍乱弧菌实验室鉴定. 疾病监测, 2007, 22(6):368-369, 380.  
[5] Singh DV, Isac SR, Colwell RR. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. J Clin Microbiol, 2002, 40(11):4321-4324.  
[6] Sharma C, Thungapathra M, Ghosh A, et al. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India. J Clin Microbiol, 1998, 36(3):756-763.  
[7] Rivera IG, Chun J, Huq A, et al. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(6):2421-2429.  
[8] Shin OS, Tam VC, Suzuki M, et al. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. MBio, 2011, 2(3):e00106-11.  
[9] Xu JY, Wang RY, Ye LM, et al. The study on toxicity of *Vibrio cholerae* non-O1 and carriers in Ningbo city. Chin J Health Lab Technol, 2006, 16(2):145-148. (in Chinese)  
徐景野, 王仁元, 叶鹿鸣, 等. 宁波市人群中非O1群霍乱弧菌携带及其毒性研究. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2):145-148.  
[10] Chen C, Wang ZQ, Liu N, et al. Characterization and molecular typing of suspected *Vibrio cholerae* isolates. Chin J Public Health, 2011, 27(1):57-58. (in Chinese)  
陈琛, 王中强, 柳楠, 等. 疑似霍乱弧菌鉴定及分子分型检测. 中国公共卫生, 2011, 27(1):57-58.  
[11] Sun JY, Ni YX. First identification and genetic analysis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase PER-1 in a strain of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. Chin J Infect Chemother, 2010, 10(5):338-341. (in Chinese)  
孙景勇, 倪语星. 非O1、非O139型霍乱弧菌中首次发现PER-1超广谱 $\beta$ 内酰胺酶. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(5):338-341.

(收稿日期:2012-06-18)

(本文编辑:张林东)