

# PulseNet China 数据库在安徽省 4 起霍乱疫情溯源中的应用

胡守奎 郑田利 胡万富 王建军 李伟 崔志刚 周海健 逢波 阙飙

**【摘要】 目的** 通过 PulseNet China 数据库对安徽省 2012 年 4 起霍乱疫情进行溯源分析。**方法** 应用 PCR 扩增霍乱弧菌 CT 和 TCP 毒力基因, 并利用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对其进行分型, 使用 BioNumerics V4.0 软件对电泳结果进行聚类分析, 并与 PulseNet China 数据库进行比对。**结果** 16 株菌经 PCR 扩增, CT 和 TCP 基因均出现目的条带。菌株经 *Not I* 和 *Sfi I* 酶切, PFGE 聚类分析显示, 13 株菌的同源性 > 98%。其中 2 株菌与 PulseNet China 数据库中湖南、四川、浙江、上海、湖北 5 省(市) 同年霍乱疫情菌株同源性达 100%。**结论** 安徽省 2012 年 4 起霍乱疫情均源自食用霍乱弧菌感染甲鱼。PulseNet China 数据库能有效、快速地对霍乱疫情溯源和预警。

**【关键词】** 中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络; 霍乱; 预警

**Application of PulseNet China Database in tracking and warning 4 cholerae outbreaks in Anhui province, in 2012** HU Shou-kui<sup>1</sup>, ZHENG Tian-li<sup>2</sup>, HU Wan-fu<sup>1</sup>, WANG Jian-jun<sup>1</sup>, LI Wei<sup>3</sup>, CUI Zhi-gang<sup>3</sup>, ZHOU Hai-jian<sup>3</sup>, PANG Bo<sup>3</sup>, KAN Biao<sup>3</sup>. 1 Anhui Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230061, China; 2 College of Public Health, Sichuan University; 3 State Key Laboratory for Infectious Disease Control and Prevention, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: WANG Jian-jun, Email: wjj@ahcdc.com.cn

**【Abstract】 Objective** To track the source of infection regarding 4 Cholerae outbreaks in Anhui province in 2012 through the application of PulseNet China Database (PNCN). **Methods** Cholerae virulence genes were amplified by PCR and typed by pulse field gel electrophoresis (PFGE). Results from electrophoresis were cluster-analyzed by BioNumerics V4.0 software and compared with PNCN. **Results** Virulence gene CT and TCP of the tested vibrio cholera showed both positive. Homology of the strains from four cholera outbreaks was more than 98%, based on the homologous and cluster analysis through enzyme digested PFGE electrophoresis. Those strains were highly homologous with the cholera epidemic strains identified in Hunan, Sichuan, Zhejiang, Shanghai and Hubei by PNCN, with the homology as 100%. **Conclusion** Four cholera outbreaks in Anhui province, 2012 were highly correlated with the outbreaks occurring in Hunan and Sichuan during the same time period, indicating that PNCN could effectively and quickly tracking down the source of infection on the cholera outbreaks and providing early warning of the situation.

**【Key words】** PulseNet China; Cholerae; Surveillance

PulseNet China 数据库对于研究霍乱的流行具有重要意义<sup>[1-4]</sup>。2012 年 8—10 月, 安徽省濉溪、怀远、宿州 3 地陆续发生 4 起与食用甲鱼相关的霍乱疫情, 本研究应用 PulseNet China 数据库对此进行溯源。

## 材料与方法

### 1. 菌株来源及鉴定: 将患者呕吐物和甲鱼肛拭

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.10.014

作者单位: 230061 合肥, 安徽省疾病预防控制中心(胡守奎、胡万富、王建军); 四川大学公共卫生学院(郑田利); 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(李伟、崔志刚、周海健、逢波、阙飙)

胡守奎、郑田利同为第一作者

通信作者: 王建军, Email: wjj@ahcdc.com.cn

子标本进行培养, 通过常规血清学方法进行鉴定, 分离出 O139 霍乱弧菌 16 株(表 1)。对 16 株菌进行霍乱毒力基因霍乱毒素 (CT) 和毒素共调节菌毛 (TCP) 检测, 基因引物序列<sup>[5]</sup>: CTF: 5' -TCT ATC TCT GTA GCC CCT ATT ACG-3'、CTR: 5' -CTC AGA CGG GAT TTG TTA GGC ACG-3'; TCPF: 5' -GAA GAA GTT TGT AAA AGA ACA C-3'、TCPFR: 5' -GAA AGC ACC TTC TTT CAC GTT G-3', 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增体系: 25 μl Premix Taq、上下游引物各 1 μmol/L, 模板 DNA 2 μl。PCR 反应: 预变性 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个

循环;72 °C 10 min。

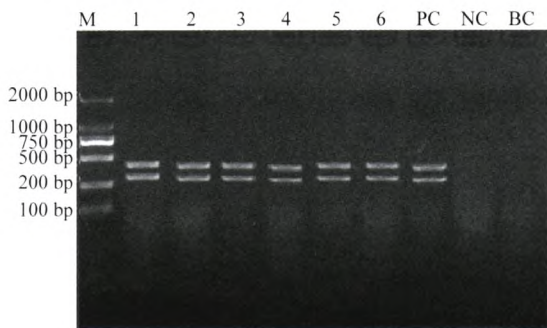
表 1 2012 年安徽省 4 起霍乱疫情 O139 群  
霍乱弧菌分离情况

分离时间 (月)	分离地区	来源		合计
		人	甲鱼	
8	濉溪县	1	1	2
8	怀远县	2	1	3
9	濉溪县	1	8	9
9	宿州市	1	1	2

2. 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型:参见 PulseNet China 网站“霍乱弧菌 PFGE 标准方案”,分子质量标准沙门菌 H9812 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所腹泻病室提供。

### 结 果

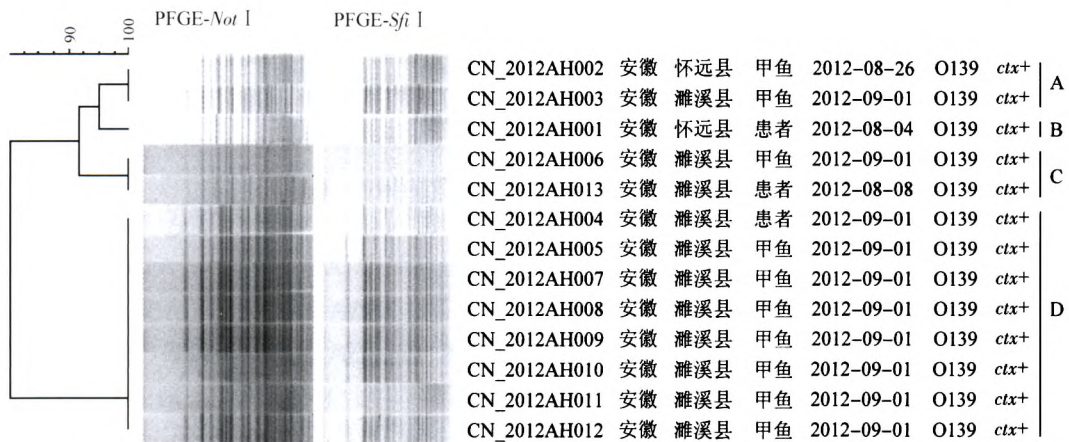
1. 霍乱弧菌毒力基因检测:16 株菌经多重 PCR 检测,均扩增出 CT、TCP 基因目的条带,部分菌株 PCR 结果见图 1。



注:M:分子标志物;1,2:患者分离株;3~6:甲鱼分离株;PC:阳性对照;NC:阴性对照;BC:空白对照

图 1 部分霍乱弧菌 CT 及 TCP 基因 PCR 扩增

2. PFGE 聚类分析:13 株霍乱弧菌以内切酶 *Not I*、*Sfi I* 酶切,电泳后,PFGE 图谱用 BioNumerics V4.0 软件进行聚类分析。结果显示,菌株分为 4 个



注:3 株菌因保存不当死亡,未用于 PFGE 分析

图 2 2012 年安徽省 4 起霍乱 O139 群霍乱弧菌 PFGE 分型

型别,其中 A 型包括 2 株菌,分离自濉溪和怀远县的甲鱼;B 型包含 1 株菌,分离自怀远县的患者;C 型包括 2 株菌,分离自濉溪县的甲鱼和患者;D 型包含 8 株菌,来自濉溪县的甲鱼和患者。13 株菌同源性 >98%(图 2)。

3. PulseNet China 数据库比对:与 2012 年国内其他省份的霍乱流行菌株进行聚类分析,结果显示,安徽 2 株菌的 PFGE 图谱与同年湖南、四川、浙江、上海、湖北菌株的 PFGE 图谱完全相同,见图 3 中方框所示,血清型均为 O139 群。

### 讨 论

实验室在霍乱传染病疫情发现中扮演“验证”角色,这种模式很难发现不同地区孤立霍乱疫情的关联性<sup>[6]</sup>。PulseNet China 网络化监测的重点在于通过实验室病原菌分子分型分析,结合网络技术,发现病例间的内在遗传联系,然后通过流行病学调查,确定传染源。

2012 年 8—10 月安徽省濉溪县、怀远县、宿州市先后发生 4 起与食用甲鱼有关的 O139 群霍乱弧菌疫情。本研究利用分子生物学技术对实验菌株进行毒力基因扩增和 PFGE 分子分型,并将 PFGE 图谱上传至 PulseNet China 数据库。结果显示,人和甲鱼分离株的 CT 和 TCP 基因均为阳性,提示甲鱼分离株具备作为传染源的基本条件。应用 BioNumerics V4.0 软件将霍乱弧菌 PFGE 图谱进行聚类分析,结果虽产生 4 种带型,但带型间差异微小,可能是霍乱弧菌在传播过程中的微小变异引起,也可能是霍乱弧菌自身变异引起<sup>[7,8]</sup>。经过调查,3 地甲鱼均购自南京市下关某水产市场,进一步调查显示,这些甲鱼来自浙江省某水产养殖基地。而在同期湖南、四川、浙

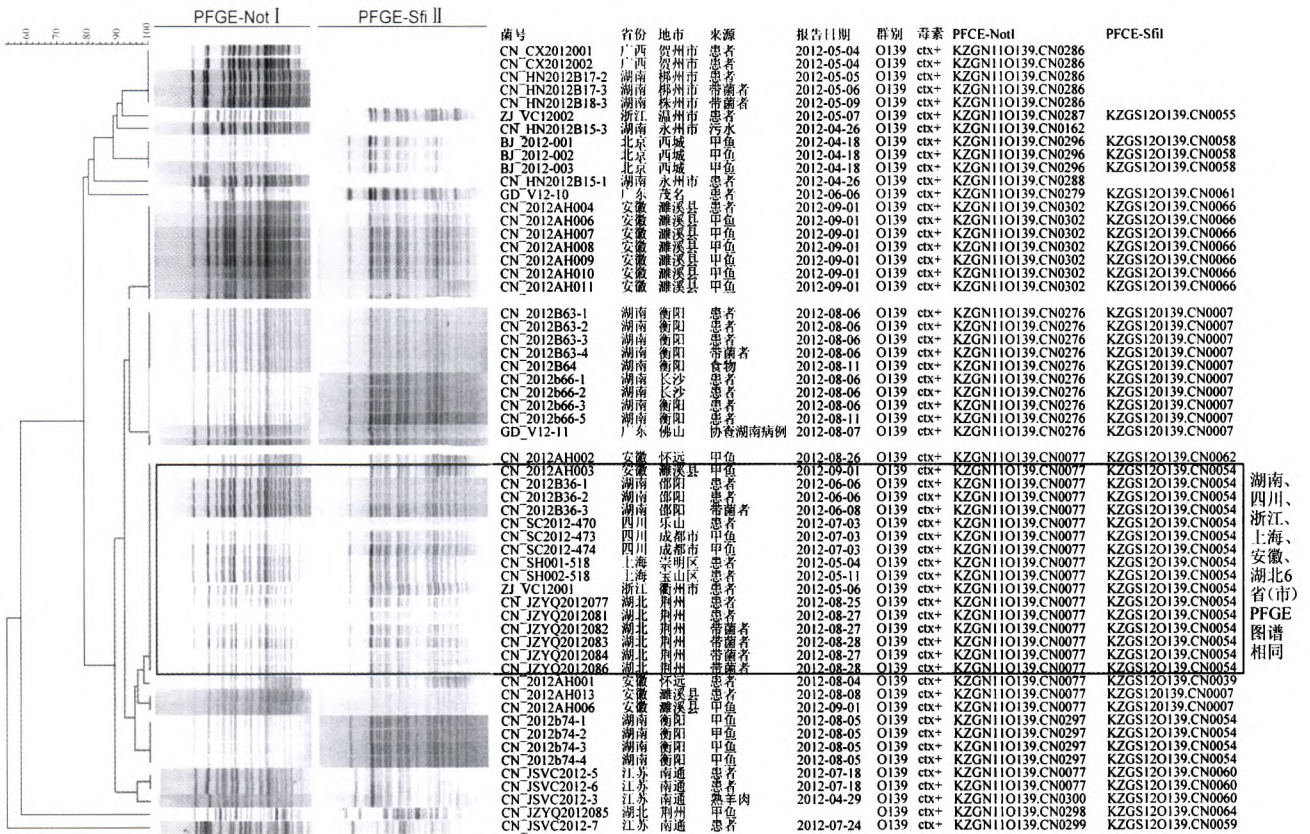


图3 2012年部分省市霍乱弧菌PFGE 型别聚类分析

江、上海、湖北等省(市)相继暴发多起因食用甲鱼而导致的霍乱疫情。将不同省份的甲鱼与患者分离株通过PulseNet网络平台, 比对结果显示PFGE带型同源性极高。结合流行病学调查, 2012年同期发生霍乱疫情的6省(市)的甲鱼均引自浙江某水产养殖基地。因此, 借助PulseNet China数据库可快速地追查至传染源, 及时切断传播途径, 有效防止霍乱疫情蔓延。

参考文献

[1] Xu JG. PulseNet China. Emerg Microbes Infect, 2012, 1(10): e29.  
 [2] Kan B, Xu JG. The laboratory networking of infectious disease surveillance. Dis Surveil, 2005, 20(1): 1-2. (in Chinese)  
 阚飙, 徐建国. 传染病监测的实验室网络化. 疾病监测, 2005, 20(1): 1-2.  
 [3] Ye C, Zhu X, Jing H, et al. Streptococcus suis sequence type 7 outbreak, Sichuan, China. Emerg Infect Dis, 2006, 12(8): 1203-1208.  
 [4] Shao Z, Li W, Ren J, et al. Identification of a new Neisseria meningitidis serogroup C clone from Anhui province, China.

Lancet, 2006, 367(9508): 419-423.

[5] Ministry of Health of the People's Republic of China. Manual for Cholera Control and Prevention of China. 5ed. 1999. (in Chinese)  
 中华人民共和国卫生部. 霍乱防治手册. 5版. 1999.  
 [6] Li W, Cui ZG, Kan B, et al. Practice on translational preventive medicine: PulseNet China. Dis Surveil, 2012, 27(2): 88-92. (in Chinese)  
 李伟, 崔志刚, 阚飙, 等. 转化预防医学的实践: PulseNet China. 疾病监测, 2012, 27(2): 88-92.  
 [7] Liu HL, Zhang JY, Feng ZH, et al. Application of pulsed field gel electrophoresis typing in tracing and carrying out surveillance programs on O139 cholera outbreaks. Chin J Epidemiol, 2006, 27(2): 102-106. (in Chinese)  
 刘红露, 张京云, 冯泽慧, 等. 脉冲场凝胶电泳分型技术在追溯O139霍乱传染来源中的应用. 中华流行病学杂志, 2006, 27(2): 102-106.  
 [8] 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: 2013-05-22)

(本文编辑: 王玉立)