

中国O1群El Tor霍乱弧菌产毒株表型多态性研究

赵璇 张力 李杰 阙飒 梁未丽

【摘要】 目的 了解近50年中国不同地区分离的O1群El Tor型霍乱弧菌产毒株的生物表型特征变化。**方法** 采用多粘菌素B敏感试验、第IV组霍乱噬菌体裂解试验、VP试验和溶血实验进行表型特征分析。**结果** 生物型表型特征分析表明133株菌具有典型的El Tor生物型表型特征,其余251株菌呈现不典型的El Tor生物型表型特征;综合*ctxB*、*rstR*基因型和生物型表型特征分析,385株检测菌株中64株为典型El Tor生物型菌株,21株菌有典型的El Tor生物型表型特征但携带古典型*ctxB*基因,杂合型特征菌有280株,根据*ctxB*、*rstR*和表型特征的不同组合可再分为45个杂合型。**结论** 中国O1群El Tor霍乱弧菌菌株呈现明显的表型多态性,传统的表型分型特征不能有效区分古典生物型和El Tor生物型菌株。

【关键词】 霍乱弧菌;生物型; *ctxB*; *rstR*

Phenotypic diversity of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains identified in China Zhao Xuan^{1,2}, Zhang Li¹, Li Jie¹, Kan Biao¹, Liang Weili¹. 1 State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, and National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Tianjin Centre for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Liang Weili, Email: liangweili@icdc.cn

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 81171640).

【Abstract】 Objective To understand the phenotypic diversity of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated from different provinces in China during the last 50 years. **Methods** Traditional biotyping testings including susceptibility to polymyxin B, sensitivity to group IV phage, Voges-Proskauer test and haemolysis of sheep erythrocytes were conducted. **Results** Data from Biotype-specific phenotype analysis revealed that only 133 isolates carried the typical El Tor phenotypes while the other 251 isolates displayed atypical El Tor phenotypes. Combined with *ctxB*, *rstR* genotypes and phenotypic characteristics, 64 isolates were identified as typical El Tor biotype, 21 were El Tor variants that showing the typical El Tor biotype-specific phenotype but with *ctxB*^{class}. 280 isolates were defined as the hybrid groups with traits of both classical and El Tor biotypes that could be further classified into 45 groups, based on the combination of genotypes of *ctxB*, *rstR* and phenotypic characteristics. **Conclusion** Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains that isolated from different provinces in China displayed high phenotypic diversity. The traditional biotype traits could not be used to correctly distinguish the two different biotypes.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Biotype; *ctxB*; *rstR*

O1群霍乱弧菌分为古典生物型和埃尔托生物型(El Tor)。国外报道了大量不典型或变异的El Tor型菌株,一些分离株中出现了古典型的*ctxB*/*rstR*;一些El Tor菌株呈现出古典生物型的表型特征,被称为hybrid或是Matlab变种^[1],这些不典型或

变异的El Tor型菌株在亚洲、非洲等地的多个国家出现并引起流行^[2-5]。为此本研究回顾性分析1961—2010年我国分离的O1群El Tor型霍乱弧菌生物表型变异特征。

材料与方法

1. 材料:

(1)实验菌株:选取1961—2010年我国27个省份分离的385株O1群霍乱弧菌菌株。选择霍乱弧菌16017和N16961作为古典生物型和典型El Tor生物型菌株的标准对照。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.023

基金项目:国家自然科学基金(81171640)

作者单位:102206 北京,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(赵璇、张力、李杰、阙飒、梁未丽);

天津市疾病预防控制中心(赵璇)

通信作者,梁未丽, Email: liangweili@icdc.cn

(2)主要试剂:VP 试剂购自广东环凯生物技术有限公司,脱纤维无菌鲜羊血购自北京兰伯瑞生物技术有限公司,多粘菌素 B 为上海生工产品,第 IV 组霍乱噬菌体常规稀释液(10⁶/ml)为实验室制备,葡萄糖磷酸盐蛋白胨水按照《霍乱防治手册》^[6]配制。

2. 方法:采用多粘菌素 B 敏感试验、第 IV 组霍乱噬菌体裂解试验、VP 试验和溶血实验进行生物表型特征分析,试验具体操作和结果判读参照《霍乱防治手册》^[6]。各菌株生物表型结果整合其 *ctxB/rstR* 基因型信息进行综合分析^[7]。

结 果

1. 生物表型检测:在检测的 385 株菌中,133 株具有典型的 El Tor 生物型表型特征,即多粘菌素 B 敏感试验阴性、第 IV 组霍乱噬菌体裂解试验阴性、VP 试验阳性、溶血试验阳性;1 株为古典生物型,与菌株原始资料信息相吻合,1963 年分离于浙江省;251 株为不典型 El Tor 生物型,即上述 4 个表型试验中至少有 1 个发生变异,与典型 El Tor 生物型的表型特征不符。多粘菌素 B 敏感试验、第 IV 组霍乱噬菌体裂解试验、VP 试验和溶血试验的变异率分别为 3.1% (12/384)、8.3% (32/384)、20.1% (77/384) 和 51.0% (196/384)。说明多粘菌素 B 敏感试验和第 IV 组霍乱噬菌体裂解试验的表型较其他 2 个表型稳定、特异,溶血表型最易变异,因而对生物型型别鉴定的意义或贡献最小。

2. 综合分析:结合前期研究对菌株 *ctxB/rstR* 基因型的检测结果^[7],并参考文献[8]方法,分析菌株综合基因型和表型特征。根据 *ctxB*、*rstR*、多粘菌素 B 敏感性、第 IV 组霍乱噬菌体裂解型和 VP 试验,将待检菌株分为四类:

第一类(El Tor 型)携带 *ctxB*^{ET},*rstR* 可以是 *rstR*^{ET} 或 *rstR*^{ET}+*rstR*^{env} 或 *rstR*^{ET}+*rstR*^{class},具有典型 El Tor 生物型表型特征,共 64 株,占总数的 16.6%。该类菌株在 1961 年和 1962 年较为常见。

第二类(El Tor variant)携带 *ctxB*^{class}、*rstR*^{ET},具有典型 El Tor 生物型表型特征,共 21 株,占总株数 5.5%。该 El Tor variant 菌株集中出现在 2005 年,其他年份极为少见。

第三类(Hybrid group)为杂合型,共 280 株,占总株数的 72.7%,根据 *ctxB/rstR* 和表型特征的不同组合存在形式可再分为 45 个不同的类别(表 1)。该杂合型菌株散在于各年份。

第四类(Unclassified)无法按上述原则根据基因

型和表型归类,共 19 株,占总株数的 4.9%,其主要特征为 *rstR* 基因存在变异,无法用针对 *rstR*^{ET}、*rstR*^{env} 和 *rstR*^{class} 的特异性引物进行扩增。

表 1 280 株杂合型 O1 群霍乱弧菌基因型和生物表型特征分类

生物型	基因型		表型特征			菌株数	
	<i>ctxB</i>	<i>rstR</i>	PB	VP	IV 噬菌体 溶血		
Hybrid group1	E	E	R	-	-	+	15
Hybrid group2	E	E	R	+	+	+	5
Hybrid group3	E	E	R	+	-	-	74
Hybrid group4	E	E	R	+	+	-	3
Hybrid group5	E	E	R	-	+	+	1
Hybrid group6	E	E	R	-	-	-	11
Hybrid group7	E	E	S	+	+	+	1
Hybrid group8	E	E	S	+	-	-	5
Hybrid group9	E	E	S	+	+	-	1
Hybrid group10	E	E	S	+	-	+	1
Hybrid group11	E	env	R	+	-	-	1
Hybrid group12	C	E	R	-	-	+	4
Hybrid group13	C	E	R	+	+	+	4
Hybrid group14	C	E	R	+	-	-	22
Hybrid group15	C	E	R	+	+	-	3
Hybrid group16	C	C+env	R	+	-	+	1
Hybrid group17	C	E	R	-	-	-	9
Hybrid group18	C	E	R	-	+	-	2
Hybrid group19	C	E	S	+	-	+	1
Hybrid group20	C	E	S	+	+	-	1
Hybrid group21	C	E+C	R	+	+	-	1
Hybrid group22	E	C	R	-	-	+	1
Hybrid group23	C	env	R	+	-	+	1
Hybrid group24	E	E+C	R	+	+	-	1
Hybrid group25	C	C	R	+	-	-	6
Hybrid group26	E	E+C	R	-	-	+	5
Hybrid group27	C	E+C	R	+	-	+	19
Hybrid group28	C	E+C	R	+	-	-	25
Hybrid group29	C	C	R	-	-	+	4
Hybrid group30	C	E+C	R	-	-	-	8
Hybrid group31	C	E+C	R	-	-	+	3
Hybrid group32	C	E+C+env	R	+	-	+	8
Hybrid group33	C	C	R	+	-	+	9
Hybrid group34	C	E+env	R	+	-	-	1
Hybrid group35	C	C	R	-	-	-	4
Hybrid group36	C	C	R	+	+	+	1
Hybrid group37	E	E+C	R	+	-	-	1
Hybrid group38	C	E+C+env	R	-	+	+	1
Hybrid group39	C	E+C	R	+	+	+	3
Hybrid group40	C	C+env	R	-	-	+	1
Hybrid group41	C	C	R	-	-	+	1
Hybrid group42	C	E+C+env	R	+	-	-	6
Hybrid group43	C	E+C+env	R	-	-	+	3
Hybrid group44	C	C+env	R	-	+	+	1
Hybrid group45	C	E+env	R	+	-	+	1

注:R 表示多粘菌素 B 敏感试验阳性;S 表示多粘菌素 B 敏感试验阴性;+ 表示阳性;- 表示阴性;C 代表古典型 *rstR*, E 代表 El Tor 型 *rstR*, env 代表环境型 *rstR*

图 1 为不同类型(不包括 Unclassified)菌株在各年代的分布,可见 20 世纪 90 年代后出现的菌株多态性明显多于 60 年代和 80 年代流行的菌株,60 年代和 80 年代的菌株主要为 El Tor 型和杂合型中属于 Hybrid group 1~9 的菌株,型别较为单一,这可能一方面是因为流行早期菌株本身变异小,另一方面与 60 年代和 80 年代流行的快速播散有关。

讨 论

O1 群 El Tor 霍乱在我国首次出现于 1961 年 6、7 月广东省西部沿海地区,在随后的 50 年间,分别在 60、80 和 90 年代出现 3 次流行高峰,自 2002 年开始连续处于低流行状态^[9]。此期间与东南亚诸国的报道相似,我国 O1 群 El Tor 菌株也积累了许多基因型和表型的变异。基于多粘菌素 B 敏感试验、第 IV 组霍乱噬菌体裂解试验、VP 试验和溶血表型的特征分析表明,除 133 株具有的典型的 El Tor 型表型特征外,其余 251 株既具

有古典生物型的某些表型特点,又具有 El Tor 生物型的表型特征,分离年代和地区无明显的规律性。综合考虑 *ctxB/rstR* 基因型特征和表型分型特征,385 株菌可分成 4 个类别,传统意义上典型的 El Tor 型菌株仅占检测菌株数的 16.6%,绝大多数为不典型菌株,传统表型分型不能确定,具有不同 *ctxB* 和 *rstR* 的基因组合。

通常认为古典生物型菌株较 El Tor 生物型菌株有更强的毒力,但后者的环境适应性更强^[10]。El Tor 生物型菌株自 1961 年出现以来已在全球范围内取代了以往流行的古典生物型菌株^[8],目前尚不清楚这种大量出现的带有古典生物型特征的 El Tor 型变种菌株对人群是否具有更强的致病性。实验室研究发现,携带古典型 *ctxB* 的 El Tor 型变种菌株比典型 El Tor 型菌株(携带 El Tor 型 *ctxB*)在兔肠段中能够引起更多的积液量,提示具有更强的毒力^[11]。应加强患者和环境来源菌株的监测,以便更好了解其变异和进化过程,利于溯源分析,为防治提供依据和参考。

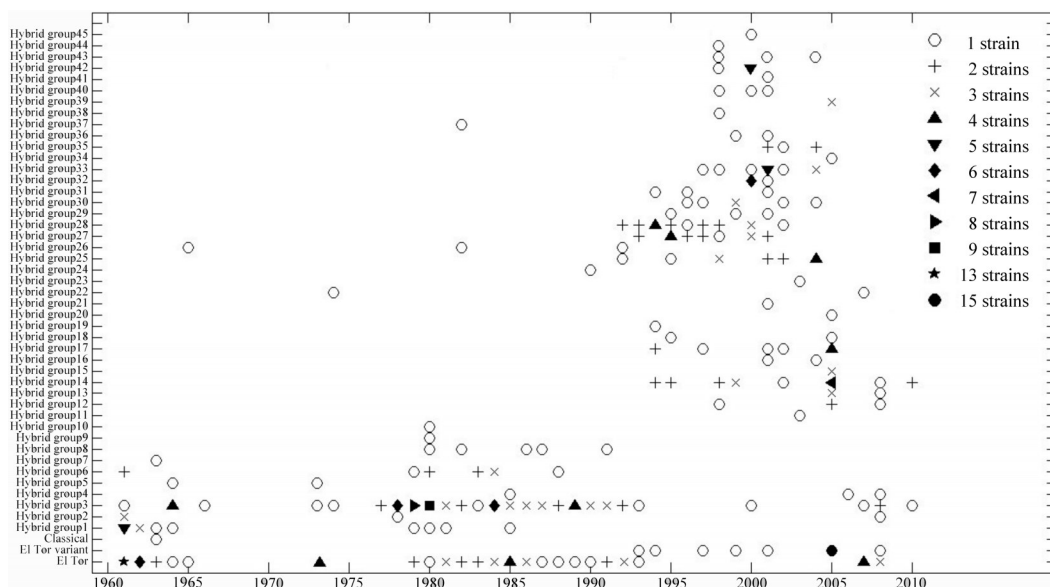


图 1 1961—2010 年我国 O1 群霍乱弧菌不同分型类别菌株的年代分布

参 考 文 献

[1] Islam MS, Mahmud ZH, Ansaruzzaman M, et al. Phenotypic, genotypic, and antibiotic sensitivity patterns of strains isolated from the cholera epidemic in Zimbabwe[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6): 2325-2327.
 [2] Safa A, Sultana J, Dac Cam P, et al. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(6): 987-988.
 [3] Kumar P, Jain M, Goel AK, et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(Pt 2): 234-238.
 [4] Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Nair BG, et al. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae* [J]. Emerg Infect Dis, 2004, 10(11): 2057-2059.
 [5] Raychoudhuri A, Patra T, Ghosh K, et al. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India[J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(1): 131-132.
 [6] Xiao DL. Handbook of cholera prevention and control[M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2013, 5. (in Chinese) 肖东楼. 霍乱防治手册[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2013, 5.
 [7] Liang WL, Zhao X, Zhang L, et al. The study of *ctxB* and *rstR*

variations of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated from 1961 to 2010 in China [J]. Chin J Prev Med, 2014 (in Chinese) [in publish].
 梁未丽, 赵璇, 张力, 等. 1961—2010 年中国 O1 群 El Tor 型霍乱弧菌产毒株 *ctxB*, *rstR* 基因变异[J]. 中华预防医学杂志, 2014. [待发表]
 [8] Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-Nguan M, et al. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand [J]. Indian J Med Res, 2011, 133: 387-394.
 [9] Liang W, Wang L, Liang P, et al. Sequence polymorphisms of *rfbT* among the *Vibrio cholerae* O1 strains in the Ogawa and Inaba serotype shifts [J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 173.
 [10] Smirnova NI, Cheldyshova NB, Zadnova SP, et al. Molecular-genetic peculiarities of classical biotype *Vibrio cholerae*, the etiologic agent of the last outbreak Asiatic cholera in Russia [J]. Microb Pathog, 2004, 36(3): 131-139.
 [11] Ghosh-Banerjee J, Senoh M, Takahashi T, et al. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(11): 4283-4286.

(收稿日期: 2014-02-10)
(本文编辑: 张林东)