

广东省 2009—2013 年霍乱弧菌病原学特征分析

李柏生 谭海玲 王多春 柯碧霞 陈经雕 何冬梅 刘美真 柯昌文 张永慧

【摘要】 目的 分析广东省 2009—2013 年霍乱病例及环境来源 O1/O139 群霍乱弧菌病原学特征。**方法** 选取 2009—2013 年广东省霍乱病例来源、环境(水体和海水产品)来源的 O1/O139 群霍乱弧菌。采用血清分型、抗菌药物敏感性试验、毒力基因 PCR 检测和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型方法,研究不同来源的霍乱弧菌血清型、抗菌药物敏感性、毒力基因携带以及分子分型方面的异同。**结果** 2009—2013 年广东省共分离得到各类来源 O1/O139 群霍乱弧菌 190 株(病例 16 株,外环境 174 株)。病例来源菌株分为 O1 群稻叶型(3 株)、小川型(7 株)和 O139 群(6 株)3 种菌型;其中 10 株 *ctxA* 基因阳性,2 株小川型菌株携带不完整 CTX Φ 噬菌体;5 株菌对 11 种抗菌药物完全敏感,3 株对 4 种抗菌药物表现出耐受。外环境来源菌株中 53 株稻叶型,22 株小川型和 2 株 O139 群菌株携带不完整 CTX Φ 噬菌体;2 株 O139 菌株检出 *ctxA* 基因阳性;25 株对 ≥ 4 种抗菌药物耐受,其中有 2 株同时对 11 种抗菌药物中的 7 种耐受,以水产品中的稻叶型菌株为主(13 株)。PFGE 分子分型结果显示,菌株经 *Not I* 酶切后的 PFGE 型别表现出明显的多样性。稻叶型和 O139 群病例菌株的带型聚集在同一个聚类中,小川型病例菌株带型分散在不同的聚类中,病例来源菌株与环境来源菌株的带型差别较大。**结论** 广东省 O1/O139 群霍乱弧菌毒力基因和遗传特征复杂多样,菌株多重耐药形势严峻,需要加强菌株型别变异及耐药监测。

【关键词】 霍乱弧菌; 抗菌药物敏感性试验; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳

Etiologic characteristics of *Vibrio cholerae* in Guangdong province in 2009–2013 Li Baisheng^{1,2}, Tan Hailing¹, Wang Duochun³, Ke Bixia¹, Chen Jingdiao¹, He Dongmei¹, Liu Meizhen¹, Ke Changwen¹, Zhang Yonghui^{1,2}. 1 Center for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 511430, China; 2 School of Public Health and Tropic Medicine, South Medical University; 3 National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Zhang Yonghui, Email: zyh@cdcp.org.cn

This work was supported by grants from the Guangzhou Medical and Health Science and Technology Projects (No. 2008–Zda–06) and the Foundation of Medical Science and Technology Research of Guangdong Province (No. B2011026).

【Abstract】 Objective To analyze the etiologic characteristics of O1/O139 *Vibrio cholerae* in Guangdong province in 2009–2013. **Methods** Isolates from cholera cases and from the environment surveillance points were investigated by serological typing, antibiotic susceptibility testings, toxic genes detection and molecular typing to analyze the similarities and differences of the identified species. **Results** Totally, 190 isolations of O1/O139 *V. cholerae* were obtained from cholera cases (16 strains) and environmental samples (174 strains) in Guangdong province in 2009–2013. The sero-types would include Inaba (3 isolates), Ogawa (7 isolates) and O139 (6 isolates) in all the isolates from the cholera cases. Ten strains from the *ctxA* positive cases were detected by PCR. Two Ogawa strains carried incomplete CTX Φ phage. Results from the antibiotic susceptibility test indicated that 5 strains were absolutely sensitive to 11 antibiotic discs in vitro, while another 3 strains were simultaneously resistant to 4 antibiotic discs. Except for 2 stains, all the O139 strains from the environment were *ctxA* negative, detected by PCR. Incomplete CTX Φ phage was found in the Inaba

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.07.016

基金项目:广州市医药卫生重点项目(2008–Zda–06);广东省医学科学研究基金(B2011026)

作者单位:511430 广州,广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所 广东省应急病原学检测重点实验室(李柏生、谭海玲、柯碧霞、陈经雕、何冬梅、刘美真、柯昌文、张永慧);南方医科大学公共卫生与热带医学学院(李柏生、张永慧);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(王多春)

通信作者:张永慧, Email: zyh@cdcp.org.cn

(53 isolates), Ogawa (22 isolates) and O139 (2 isolates), respectively. Results from the antibiotic susceptibility test exhibited that 25 strains were resistant simultaneously to 4 and/or more antibiotic discs, especially the Inaba strains from the seafoods (13 isolates). 2 Inaba strains from seafood were simultaneously resistant to 7 antibiotic discs. Results from PFGE molecular typing indicated that the PFGE types digested by *Not I* expressed significant diversity. Inaba and O139 strains from cases were gathered in the same clusters, while the Ogawa strains from cases scattered in different clusters but no significant correlation among these strains were found. Our results suggested that a distant genetic relationship might exist between these two different sources strains. **Conclusion** Complex and diverse as the virulence genes and genetic characteristics and with the grim situation of multi-drug resistant strains, all seemed important to strengthen the surveillance programs on the variation of strain types and antibiotics resistance of O1/O139 *V. cholerae* in Guangdong province.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Antibiotic susceptibility test; Toxic gene; Pulsed field gel electrophoresis

O1/O139群霍乱弧菌是引起霍乱的病原体,根据O抗原的不同,霍乱弧菌可分为206个血清群,其中,O1群又可分为小川、稻叶及彦岛型^[1]。霍乱弧菌的致病主要与霍乱肠毒素基因 *ctxAB* 和毒素协同菌毛 *tcpA* 基因有关,其他毒力基因如 *ace*、*zot*、*tcpI*、*hlyA*、*toxR* 和 *ompU* 等与霍乱弧菌的生长繁殖或致病性密切相关^[2,3]。本研究收集2009—2013年广东省病例和外环境中分离的190株O1/O139群霍乱弧菌,分析其血清型、抗菌药物敏感性、毒力基因等表型特征。

材料与方法

1. 菌株及试剂来源:2009—2013年广东省各地市在霍乱疫情处理及常规监测中分离得到的O1/O139群霍乱弧菌190株。其中,病例来源16株,外环境来源174株(水产品65株、水体109株)。标准参照菌株为N16961(O1群)和MO45(O139群),选择性分离培养基选用碱性蛋白胨水和庆大霉素培养基(广东环凯公司),O1群稻叶型、小川型和O139群诊断血清购自泰国S&A公司。

2. 增菌分离鉴定:采用碱性蛋白胨水增菌培养法培养细菌,采用庆大霉素培养基划线分离法进行菌株鉴定和血清分型^[1]。

3. 抗菌药物敏感试验:采用Kirby-Bauer纸片法进行抗菌药物敏感试验,11种抗菌药物分别为氨苄西林(AMP, 10 μg),四环素(TCY, 30 μg),复方新诺明(SXT, 1.25 μg/23.5 μg),氯霉素(CHL, 30 μg),多西环素(DOX, 30 μg),诺氟沙星(NOR, 10 μg),环丙沙星(CIP, 5 μg),阿米卡星(AMK, 30 μg),头孢噻肟(CTX, 30 μg),头孢曲松(CRO, 30 μg),萘啶酸(NAL, 30 μg)。其中,AMP、TCY、SXT、CHL为美国临床实验室标准化协会推荐,其抑菌圈判定标准参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)出版的药敏试验指南。DOX、NOR、CIP、AMK为《霍乱防治

手册》(5版)推荐,其抑菌圈判定标准参照《霍乱防治手册》(5版)上相关标准,CTX、CRO、NAL为本实验室内部监测药物,抑菌圈判定标准参照CLSI药敏试验指南中规定的肠杆菌科抑菌圈直径判定标准。药敏试验采用ATCC25922大肠埃希菌做质控菌株。所有抗菌药物纸片及M-H琼脂平板购自OXOID公司,实验结果采用WHONET 5.4软件进行录入和分析。

4. 毒力基因的检测:使用天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组DNA,用多重PCR扩增8种毒力基因(*ctxA*、*tcpA*、*ace*、*zot*、*tcpI*、*hlyA*、*toxR* 和 *ompU*)。各毒力基因引物序列参考相关文献^[4-6],由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。毒力基因检测在德国Biometra公司温度梯度PCR仪上进行,设立空白对照(试剂)和阳性对照(N16961)。PCR反应体系为25 μl,内含12.5 μl Taq Premix(2×),上、下游各1 μl,模板DNA 2 μl。扩增条件:94 ℃ 2 min; 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 25个循环; 72 ℃, 4 min。PCR产物电泳后观察结果。

5. 脉冲场凝胶电泳(PFGE):参照文献[7]进行,胶块内染色体DNA使用*Not I*进行酶切(标准菌株H9812用*Xba I*酶切,内切酶购自Promega公司),在脉冲场电泳仪CHEF Mapper(Bio-Rad公司)上电泳,利用BioNumerics软件(Applied Maths BVBA)分析图谱,得到菌株带型相似性的聚类分析树图。

结 果

1. 血清型分布:190株霍乱弧菌的血清型别分布见图1。外环境来源菌株中O1群稻叶型101株、小川型55株、O139群14株、彦岛型4株。病例来源菌株多为小川型,每年均有小川型病例,个别年份出现稻叶型(2010年)和O139群(2010、2012和2013年)病例。

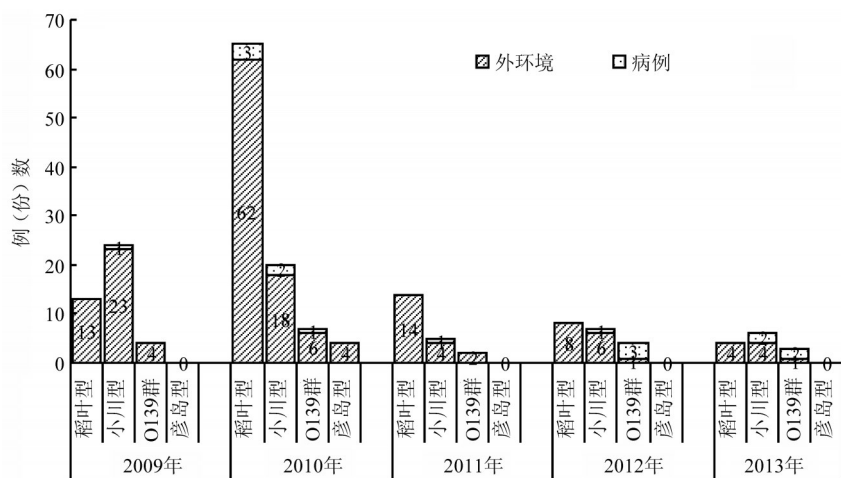


图1 2009—2013年广东省O1/O139群霍乱弧菌血清型别分布

2. 抗菌药物敏感性: 对其中174株O1/O139群霍乱弧菌进行了11种抗菌药物敏感性试验, 结果显示, NAL的耐药率最高, TCY、SXT、DOX和AMP为中等耐药, AMK、CIP和NOR有低度耐药, CTX和CRO则完全敏感, 部分菌株对氯霉素中度敏感, 见表1。

表1 2009—2013年广东省174株O1/O139群霍乱弧菌抗菌药物敏感性试验

抗菌药物	耐药 (耐药率, %)	中度敏感 (敏感率, %)	敏感 (敏感率, %)
NAL	108(62.07)	2(1.15)	64(36.78)
TCY	58(33.33)	6(3.45)	110(63.22)
SXT	40(22.99)	13(7.47)	121(69.54)
DOX	40(22.99)	12(6.90)	122(70.11)
AMP	39(22.41)	15(8.62)	120(68.97)
CHL	23(13.22)	42(24.14)	109(62.64)
AMK	4(2.30)	6(3.45)	164(94.25)
CIP	3(1.72)	10(5.75)	161(92.53)
NOR	3(1.72)	3(1.72)	168(96.55)
CTX	0(0.00)	0(0.00)	174(100.00)
CRO	0(0.00)	0(0.00)	174(100.00)

从菌株的耐药组合看, 大部分菌株只对其中的1种或2种抗菌药物表现出耐药, 但也有部分菌株出现多重耐药, 见表2。174株O1/O139群霍乱弧菌中, 有30株对≥4种抗菌药物耐受, 其中2株同时对11种抗菌药物中的7种产生耐受。外环境来源菌株的多重耐药比较严重, 尤以水产品来源菌株多见, 以稻叶型菌株为主, 30株对≥4种抗菌药物耐药的菌株中, 21株为稻叶型, 均分离自外环境。16株病例来源菌株中,

5株对11种抗菌药物完全敏感, 3株对4种抗菌药物耐受, 其中2株为O139群(TCY + SXT + NAL + DOX), 1株为小川型(SXT + NAL + CHL + AMP)。

3. 毒力基因检测: 运用多重PCR对190株O1/O139群霍乱弧菌菌株进行8种毒力基因检测, 所有菌株均含有 *hlyA* 和 *toxR* 基因。16株病例来源菌株中, 10株检出 *ctxA* 基因阳性, 其中9株为8种毒力基因阳性。4株 *tcpA* 基因阳性的小川型病例菌株中, 1株 *ctxA⁻ace⁻zot⁺* 菌株, 其余3株为 *ctxA⁻ace⁻zot⁻* 菌株。外环境来源菌株以不产毒菌株为主, 174株外环境菌株检出2株O139群菌株携带 *ctxA* 基因, 分别分离自外环境水体和水产品, 其余均为 *ctxA* 基因阴性。101株外环境稻叶型菌株中有2株携带 *tcpA* 基因, 53株 *ctxA⁻ace⁺zot⁺* 的菌株。55株外环境小川型菌株中, 14株 *tcpA* 基因阳性, 21株为 *ctxA⁻ace⁺zot⁺* 菌株, 1株为 *ctxA⁻ace⁻zot⁺* 菌株。14株外环境O139群菌株中, 2株 *ctxA* 基因阳性, 2株为 *ctxA⁻ace⁻zot⁺* 菌株, 见表3。

4. PFGE分型: 根据菌株来源属性, 如分离的时

表2 2009—2013年广东省O1/O139群霍乱弧菌多重耐药谱

耐药谱	菌株数	菌株来源及血清型
NOR+TCY+CIP+SXT+NAL+CHL+DOX	1	水产品, 稻叶型
TCY+SXT+NAL+CHL+AMP+DOX+AMK	1	水产品, 稻叶型
NOR+CIP+SXT+NAL+CHL+DOX	2	水产品, 稻叶型
TCY+SXT+NAL+CHL+AMP+DOX	1	水产品, 稻叶型
TCY+SXT+CHL+AMP+DOX	4	水产品, 稻叶型(2); 水体, 小川型(2)
TCY+SXT+NAL+CHL+AMP	2	水产品, 小川型(1); 水体, 稻叶型(1)
TCY+SXT+NAL+CHL+DOX	1	水体, 彦岛型
TCY+SXT+NAL+AMP+DOX	2	水产品, 稻叶型
TCY+SXT+NAL+AMP	1	水产品, 稻叶型
TCY+SXT+NAL+DOX	5	水体, 稻叶型(2); 水产品, 稻叶型(1); 病例, O139群(2)
TCY+NAL+CHL+DOX	6	水体, 稻叶型(3), 小川型(1); 水产品, 稻叶型(1), 小川型(1)
SXT+NAL+CHL+AMP	2	水体, 稻叶型(1); 病例, 小川型(1)
TCY+NAL+DOX+AMK	1	水产品, 稻叶型
TCY+NAL+AMP+DOX	1	水体, 稻叶型

注: 括号内数据为菌株数

表 3 2009—2013 年广东省 O1/O139 群霍乱弧菌毒力基因特征

毒力基因特征	O1				O139	
	稻叶		小川		病例	外环境
	病例	外环境	病例	外环境		
<i>hlyA+toxR+ctxA+ace+zot+tcpA+tcpI+ompU</i>	3	0	1	0	5	2
<i>hlyA+toxR+ctxA+ace+tcpA</i>	0	0	1	0	0	0
<i>hlyA+toxR+ace+zot+tcpA+tcpI+ompU</i>	0	1	0	5	0	0
<i>hlyA+toxR+ace+zot+tcpA+ompU</i>	0	0	0	2	0	0
<i>hlyA+toxR+zot+tcpA+tcpI+ompU</i>	0	0	1	0	0	0
<i>hlyA+toxR+tcpA+tcpI+ompU</i>	0	1	1	5	0	0
<i>hlyA+toxR+tcpA+ompU</i>	0	0	0	2	0	0
<i>hlyA+toxR+tcpA</i>	0	0	2	0	0	0
<i>hlyA+toxR</i>	0	2	0	17	1	10
<i>hlyA+toxR+ace+zot+tcpI+ompU</i>	0	30	1	10	0	0
<i>hlyA+toxR+ace+zot+ompU</i>	0	22	0	4	0	0
<i>hlyA+toxR+ace+zot</i>	0	1	0	0	0	0
<i>hlyA+toxR+zot+tcpI+ompU</i>	0	0	0	1	0	0
<i>hlyA+toxR+tcpI+ompU</i>	0	31	0	10	0	0
<i>hlyA+toxR+zot+ompU</i>	0	2	0	0	0	0
<i>hlyA+toxR+ompU</i>	0	10	0	2	0	0
<i>hlyA+toxR+zot</i>	0	0	0	0	0	2
<i>hlyA+toxR+tcpI</i>	0	1	0	1	0	0
合计	3	101	7	59	6	14

间、地点和样品属性的异同点,在 2009—2013 年分离的 190 株 O1/O139 群霍乱弧菌中,选择 141 株进行 PFGE 分型 (*Not I* 酶切),共分为 133 个型别。19 株 O139 群菌株 PFGE 带型相似度为 69.1%~100.0%,分成 3 个聚类 (I~III),见图 2,病例来源的 5 株 O139 群霍乱弧菌 PFGE 带型均处于聚类 III,各自经 *Not I* 酶切后的带型不同,聚类 I 和聚类 II 全部为水体来源的菌株。

O1 群稻叶型霍乱弧菌的 PFGE 带型相似度范围

在 72.3~100.0%,分为 4 个聚类 (I~IV),见图 3。病例菌株在聚类 I,其中 1 例与其密切接触者的菌株经 *Not I* 酶切后的带型显示出 100.0% 的相似性,与另外 1 株病例菌株有 2~3 个条带数目和位置的差别,相似度为 89.9%。其余非产毒外环境来源菌株主要分布聚类 II~IV。

O1 群小川型霍乱弧菌的 PFGE 带型相似度范围在 73.1~100.0%,分为 5 个聚类 (I~V),见图 4。病例来源菌株分散在其中的 4 个聚类 (I、III、IV 和

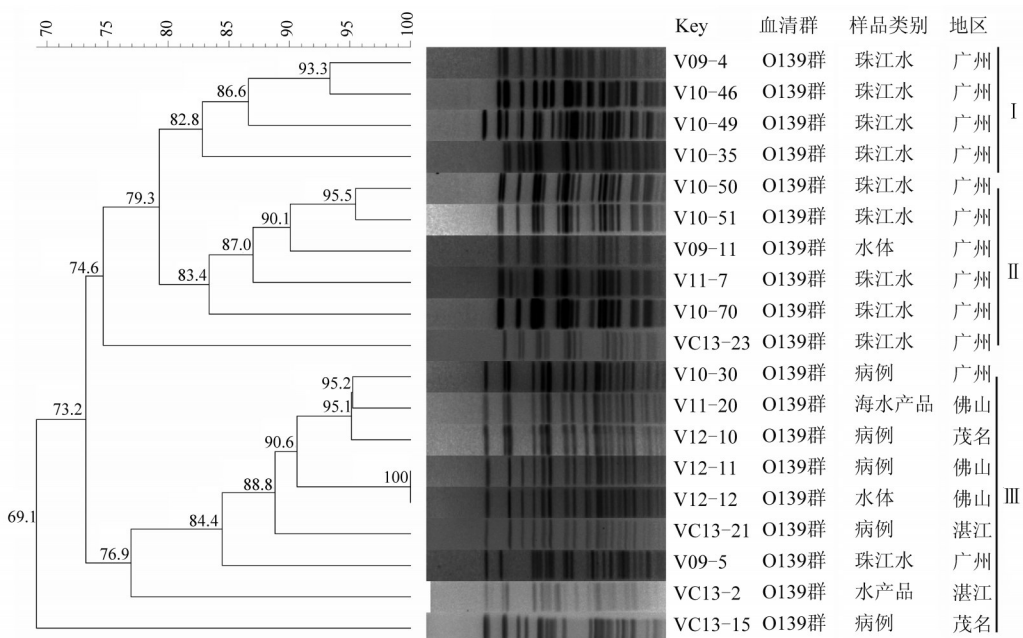


图 2 O139 群霍乱弧菌 PFGE 分型

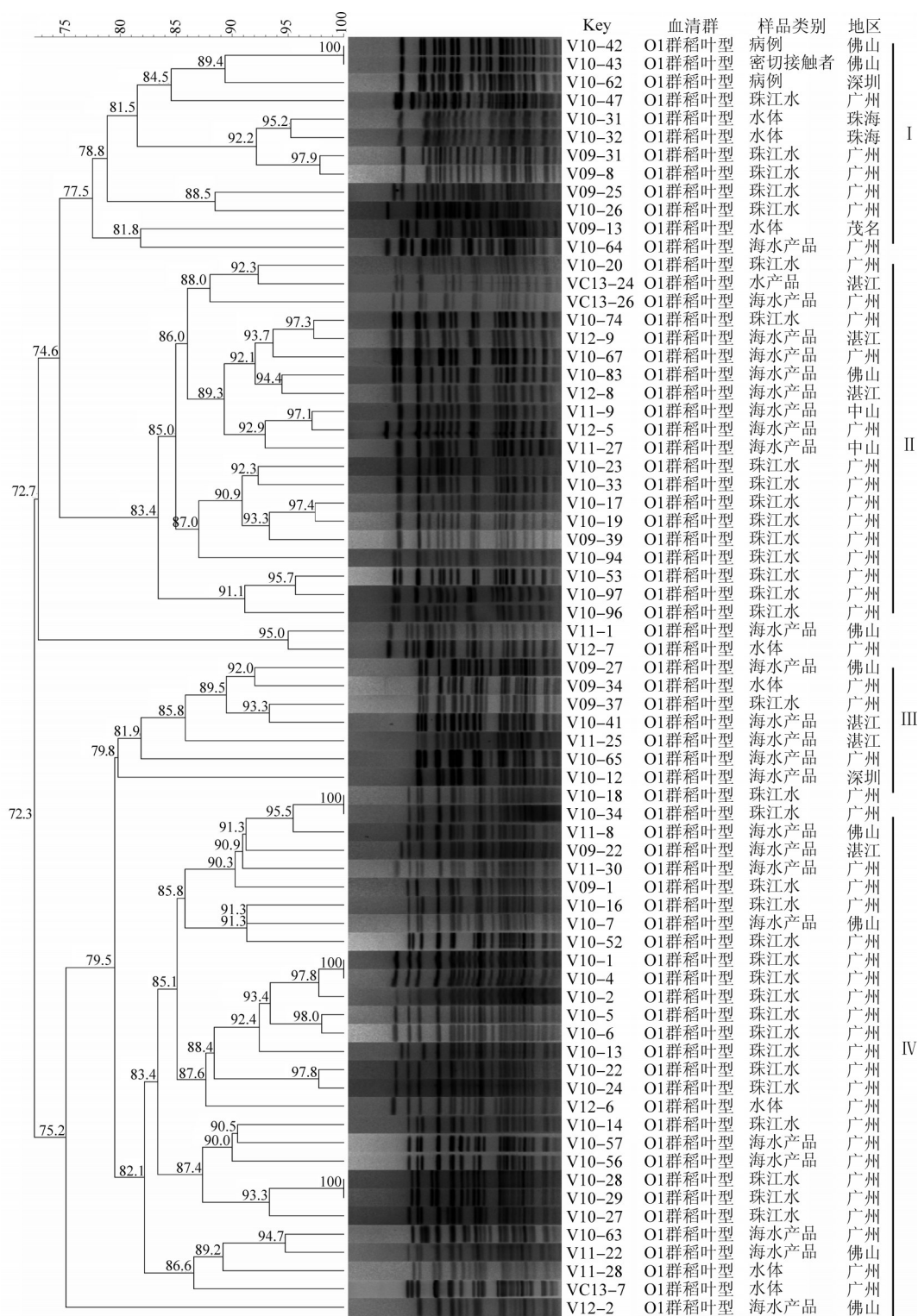


图3 O1 群稻叶型霍乱弧菌 PFGE 分型

V),各病例菌株经 *Not I* 酶切后的带型存在多个条带数目和位置的差别,与外环境菌株的 PFGE 带型不同。聚类 I 中有 3 株水体来源的菌株经 *Not I* 酶切后的带型表现出 100.0% 相似性,聚类 II 中有 1 株水体来源菌株与海水产品来源菌株 *Not I* 酶切后的带型表现出 100.0% 相似性,分布在不同的地区。

讨论

2009 年以来,广东省霍乱处于流行间歇期,每年只有零星散发的霍乱病例出现,且各种血清型菌株均可见。值得注意的是,病例来源的小川型菌株大部分为非产毒株,且有 2 株携带不完整的 CTX Φ

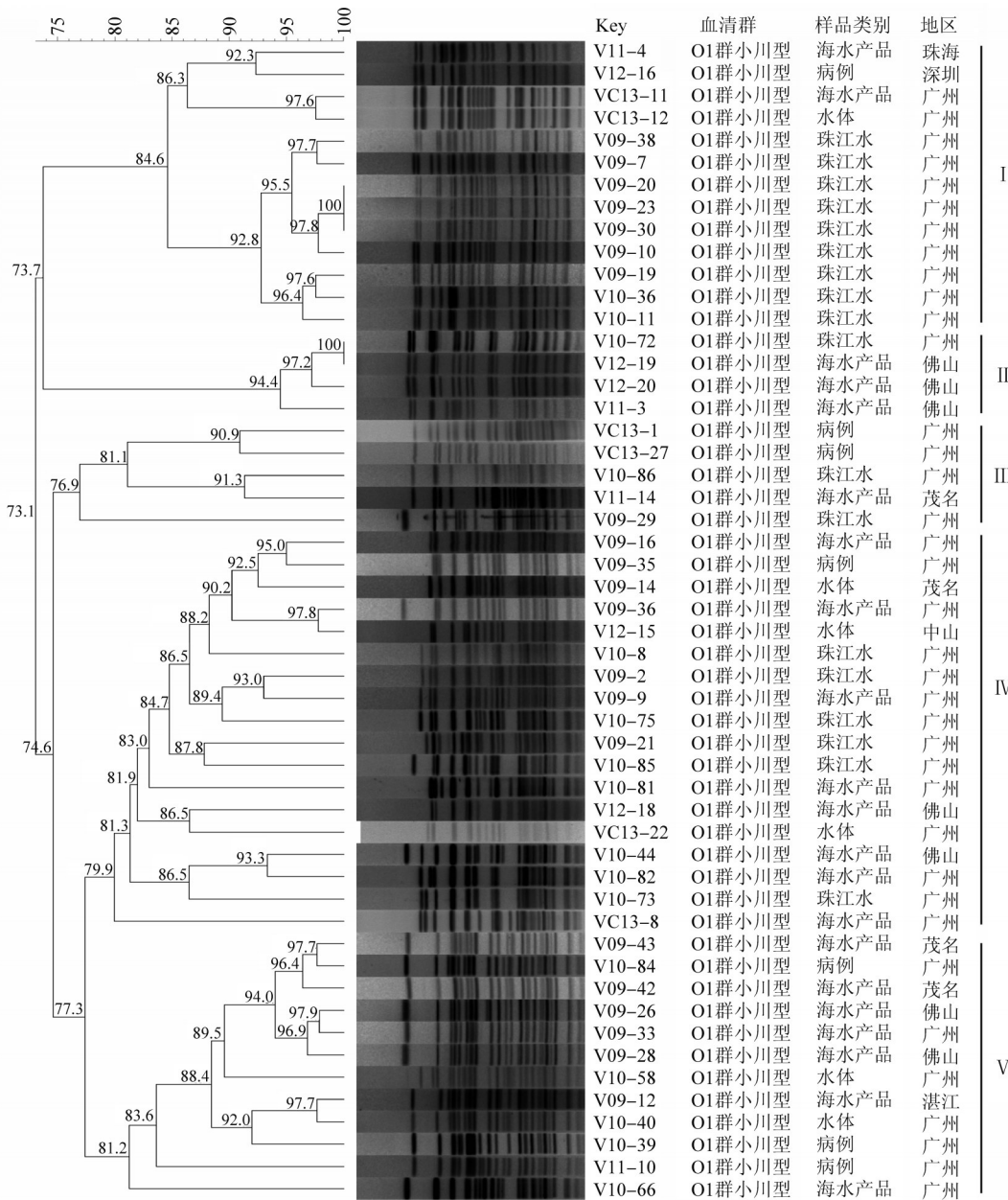


图4 O1群小川型霍乱弧菌PFGE分型

噬菌体。环境来源的菌株中,只发现2株O139群菌株 *ctxA* 阳性,其余的均为非产毒株,但是,大量菌株携带不完整的CTXΦ噬菌体。与国内外其他地方的发现一致,这些CTXΦ噬菌体上存在某个元件缺失^[6,8,9]。这些现象提示, *ctxA* 阳性或者携带完整的CTXΦ噬菌体并非霍乱弧菌感染人体引起腹泻的唯一原因,在一定的条件下,非产毒株同样可以感染人体引起霍乱样腹泻。值得注意的是,2010年在外环境水体中检测出4株非产毒的彦岛型菌株,提示菌株在外环境中容易发生菌型的变异。

抗菌药物敏感性分析发现,菌株对CRO、CTX、CIP、AMK和NOR等抗菌药物的敏感性高,可作为

临床治疗霍乱的首选药物,但研究中也发现霍乱弧菌对CIP中度敏感性比例不断增高,目前国内其他地区也发生类似现象^[10],提示需要加强监测霍乱弧菌对常规药物的敏感性,指导临床合理用药,并对其耐药机制进行深入分析。此外,从耐药组合看,外环境菌株的耐药相对病例比较严重,有一部分为多重耐药菌株,尤以水产品中的稻叶型菌株为主,说明本研究中外环境菌株和病例菌株可能没有直接的传播关系,同时也提示需要加强对养殖业抗菌药物使用的监测和规范。

PFGE分子分型结果显示,菌株经*Not I*酶切后的带型表现出明显的多样性。本研究中,稻叶型和

O139群病例菌株主要为产毒株,其PFGE带型在各自血清型菌株之间的差别不大,聚集在同一个聚类中,仅存在2~3个条带数目和位置的差异,提示亲缘关系较近,而小川型病例菌株以非产毒株为主,其PFGE带型相差较大,分散在不同的聚类中,菌株之间无明显相关性,提示亲缘关系较远。病例和外环境菌株之间经Not I酶切后的PFGE带型相差较大,从遗传角度提示本研究中的病例菌株和外环境菌株间没有直接的传播关系^[11,12]。V10-42和V10-43这2株O1群稻叶型菌株Not I酶切后的PFGE带型相似度为100%,同时,流行病学调查也证实这2株菌分离自同一起疫情的病例和带菌者,提示PFGE分子分型技术在霍乱暴发或者流行时对共同暴露者进行确认和溯源分析具有实际的应用价值。

参 考 文 献

- [1] The Department Disease Control of Ministry of Health of China. Cholera Prevention and Control of Manual (the fifth Edition) [M]. Beijing: Ministry of Health of China, 1999. (in Chinese)
卫生部疾病控制司. 霍乱防治手册[M]. 5版. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1999.
- [2] Waldor MK and Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin [J]. Science, 1996, 272:1910-1914.
- [3] Karaolis DKR, Johnson JA, Bailey CC, et al. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:3134-3139.
- [4] Shi L, Miyoshi S, Hiura M, et al. Detection of genes encoding cholera toxin (cholera toxin), zonula occludens toxin (ZOT), accessory cholera enterotoxin (ACE) and heat stable enterotoxin (ST) in *Vibrio mimicus* clinical strains[J]. Microbiol Immunol, 1998, 42:823-828.
- [5] Rivera ING, Chun J, Huq A, et al. Genotype associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae* [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67:2421-2429.
- [6] Singh DV, Matte MH, Matte GR, et al. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67:910-921.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention. Rapid Standardized Laboratory Protocol for Molecular Sub typing of *Vibrio cholerae* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) [M]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2006.
- [8] Wang M, Li XQ, Mo ZY, et al. Analysis of characteristics of major pathogenicity-related genes of *Vibrio cholerae* isolated in Guangzhou area from 2001 to 2005[J]. Chin J Prev Med, 2006, 40(4):257-261. (in Chinese)
王鸣, 李孝权, 莫自耀, 等. 2001-2005年广州地区霍乱弧菌主要致病相关基因特征分析[J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(4):257-261.
- [9] Kan B, Qi GM, Liu YQ, et al. Genome of bacteriophage CTXΦ without the presence of *ctxAB* exists in *ctxAB*- strains of *Vibrio cholerae* [J]. Chin J Microbid Immunol, 1999, 19(3): 175-179. (in Chinese)
阚飙, 祁国明, 刘延清, 等. 霍乱弧菌中存在不含霍乱毒素基因的噬菌体 CTXΦ 基因组[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19(3):175-179.
- [10] Li J, Yan HQ, Liu GR, et al. A study on antibiotic resistance and virulence gene of *Vibrio cholerae* in Beijing from 2006 to 2007 [J]. Chin J Exp Clin Infect Dis, 2009, 3(4): 366-371. (in Chinese)
李洁, 严寒秋, 刘桂荣, 等. 北京地区2006-2007年霍乱弧菌耐药状况及霍乱毒素基因的研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2009, 3(4):366-371.
- [11] Zhou H, Zhao X, Wu R, et al. Population structural analysis of O1 El Tor *Vibrio cholerae* isolated in China among the seventh cholera pandemic on the basis of multilocus sequence typing and virulence gene profiles[J]. Infect Genet Evol, 2014, 22:72-80.
- [12] Zhang P, Zhou H, Diao B, et al. A molecular surveillance reveals prevalence of *Vibrio cholerae* O139 isolates in China, 1993-2012 [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(4):1146-1152.

(收稿日期:2014-02-27)

(本文编辑:万玉立)