

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

刘红露 张京云 冯泽惠 李伟 崔志刚 章丽娟 祝小平 阙飙

【摘要】 目的 分析四川省 2004 年 7 起因聚餐暴发霍乱疫情的分离菌株之间,及其与常规监测中从外环境、水产品中分离的霍乱弧菌之间的分子分型特征和遗传相关性,查找霍乱传染来源。方法 利用聚合酶链反应检测霍乱毒力基因(*ctxAB*),用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对菌株进行分子分型,所得结果以 BioNumerics V 4.0 软件 UPGMA 方法进行聚类分析。结果 所试 72 株 O139 群霍乱弧菌中所有 4 株从河水分离的菌株 *ctxAB* 阴性,其余均具有 *ctxAB*,为产毒株。对其中的 67 株菌以 *Not I* 酶切后 PFGE 可分为 16 个型别。从甲鱼分离的 O139 群霍乱弧菌与同期流行的 O139 群霍乱弧菌优势 PFGE 型别一致,并且也为产毒株。7 起暴发中分离的菌株型别各不相同。结论 2004 年四川省 O139 霍乱暴发感染来源复杂,提示并非因为菌株在该地持续存在而引起,但甲鱼可能是 2004 年度霍乱聚餐暴发的主要传染来源之一。

【关键词】 霍乱; 脉冲场凝胶电泳; 分子分型

Application of pulsed-field gel electrophoresis typing in tracing and carrying out surveillance programs on O139 cholera outbreaks LIU Hong-lu*, ZHANG Jing-yun, FENG Ze-hui, LI Wei, CUI Zhi-gang, ZHANG Li-juan, ZHU Xiao-ping, KAN Biao. *Sichuan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, 610031, China

Corresponding authors: ZHU Xiao-ping, Email: xiao-pingzhu@163.com KAN Biao, Email: kanbiao@icdc.cn

【Abstract】 Objective To study the characteristics of molecular typing and phylogenetic relationship among the *Vibrio cholerae* serogroup O139 strains isolated from environment and sea food samples during cholera outbreaks, in Sichuan province in 2004 and to trace the source of infections so as to support the ascertainment of epidemic control strategy. **Methods** Cholera toxin gene was detected by polymerase chain reaction amplification. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for subtyping of isolates and clustering of patterns was analysed with the software BioNumerics. **Results** In all the 72 strains under analysis, 68 appeared to be toxigenic while 4 from river water derived isolates were toxin gene negative. Sixty-seven strains were clustered into 16 PFGE patterns when digested with *Not I*. The patterns of toxigeinc O139 strains isolated from turtles in the markets were identical with the patterns of strains appeared in the outbreaks respectively. The PFGE patterns of isolates from different outbreaks were inconsistent. **Conclusion** The sources of infection causing these outbreaks were complicated. Contaminated turtles might also be one of the major sources of outbreaks when being served at the dinner parties in Sichuan in 2004.

【Key words】 Cholera; pulsed-field gel electrophoresis; molecular typing

从 1982 年至今,霍乱在四川省引起过多次的不同规模的爆发性流行,尤其从 1993 年开始,每年均

有以食源性为主的暴发。由于霍乱流行的固有特征,以及社会的发展、流动人口增多、商贸大流通等因素,霍乱疫情多呈现“来无影、去无踪”的特点,且有些霍乱的传播流行规律表现也不典型。1982 - 1992 年四川省霍乱为输入性,1993 年后的多起疫情无法找到传染来源。同时霍乱流行菌型也有所改变,近些年菌型变化表现为 O1 群小川优势型→多菌型→单独 O139 群。1999 年 O139 群霍乱传入四

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2003BA712A05-04)

作者单位:610031 成都,四川省疾病预防控制中心(刘红露、冯泽惠、祝小平);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(张京云、李伟、崔志刚、章丽娟、阙飙)

通讯作者:祝小平,Email: xiao-pingzhu@163.com 阙飙,Email: kanbiao@icdc.cn

祝小平、阙飙同为责任作者

川省至今,呈现出散发向暴发转变的趋势,2003、2004 年四川省霍乱暴发仅由 O139 群霍乱弧菌引起,且以食源性暴发为主。在 O139 群霍乱的流行中目前多表现为带菌多、发病少及轻型多、重症少的现象。因而,霍乱传染来源的追索一直是霍乱防治工作中亟待解决的问题。为了分析四川省 O139 霍乱聚餐暴发的菌型特征,并分析暴发来源菌株与食品和环境监测中分离菌株的相关性,我们运用脉冲场凝胶电泳(PFGE)、聚合酶链反应(PCR)等方法对四川省 2004 年 O139 群霍乱弧菌进行了分子流行病学研究,并结合流行病学资料对暴发和可能的传染来源进行分析。

材料与方 法

1. 实验用菌株:72 株受试菌为 2004 年四川省 8 个地区霍乱监测以及疫情处理分离所得(表 1),包括 7-10 月间 7 起聚餐引起的暴发中分离的菌株。其中患者和带菌者分离 59 株、疫点厕所分离 3 株、常规监测中分离自河水 4 株和甲鱼 6 株(以下简称甲鱼株)。所有菌株经四川省疾病预防控制中心细菌性疾病控制所鉴定为霍乱弧菌 O139 群。PFGE 分析用分子量标准的参考菌株——沙门菌 H9812 为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建立)中的标准菌株。

2. 试剂和仪器:琼脂糖 SeaKem Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland)、稀有位点限制性内切酶 *Not* I (大连宝生物工程有限公司 TaKaRa 产品)、蛋白酶 K(MERCK 公司产品)等试剂用于脉冲场凝胶电泳。以 PCR 检测霍乱毒素基因的 *ctxAB* 引物序列^[1], P1: 5'-CGT AGC ACC AGG CGT TTA AG-3', P2: 5'-GAT CGG CAC GTA AGA GGT CT-3', 扩增产物 749 bp。脉冲场凝胶电泳仪为 Bio-Rad CHEF-DRIII 系统和 Bio-Rad CHEF Mapper XA 系统,凝胶成像仪为 Bio-Rad Gel Doc XR 系统,PCR 扩增仪使用 MJ 公司的 PTC200,测定培养细菌浓度(A 值)的光度计为 bioMerieux Vitek Colorimeter。

3. 实验方法:

(1) *ctxAB* 检测:方法参考文献[2],以 20 μ l 扩增体系,PCR 循环参数:预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min,后续循环 94 $^{\circ}$ C 30 s;58 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 60 s;30 个循环,末轮循环 72 $^{\circ}$ C 10 min。

(2) PFGE 实验:步骤参考文献[2],取新鲜琼脂培养基集菌于 1 ml 细胞悬液(100 mmol/L Tris-HCl: 100 mmol/L EDTA, pH 值 8.0)中,调节浓度,使其 A 值为 4.2 左右。取 400 μ l 菌悬液 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min,分别加入蛋白酶 K 至终浓度 0.5 mg/ml,再与等体积低溶点琼脂混合,倒入模具。取出胶块加 5 ml 细胞裂解液(50 mmol/L Tris:50 mmol/L EDTA, pH 值 8.0 加 1% 十二烷基肌氨酸钠)和 25 μ l 蛋白酶 K (终浓度 0.1 mg/ml),54 $^{\circ}$ C 水浴轻摇 2 h,预热 TE 50 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 洗胶块 4 次。切 2 mm 胶块加入 195 μ l 酶切缓冲液中,再加入 5 μ l *Not* I,37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h,沙门菌 H9812 选择 *Xba* I 酶切,其余参数与受试菌株相同。酶切好的胶块粘在梳子上制胶、电泳,电泳时泵设为 70,电泳温度 14 $^{\circ}$ C,电压 6 V,夹角 120 $^{\circ}$,脉冲时间 2-18 s,电泳 18 h。EB 染色 20 min,纯水脱色 30 min,凝胶成像仪上读取图像。

4. 统计学分析:使用 BioNumerics V4.0 软件进行聚类分析,方法采用 UPGMA,聚类相似性系数(距离)采用的是基于条带比较的 Dice。Dice = $2 \times N / (N + M)$,式中 N 表示能匹配的条带的个数, M 表示所有条带的个数(两个菌带型上的条带个数总和,再减去匹配的条带个数)。

结 果

对收集的菌株进行霍乱毒素基因 *ctxAB* 的检测,发现从河水样本中分离的 4 株 O139 群霍乱弧菌 *ctxAB* 为阴性,其余 68 株均能在 749 bp 处扩增出一条带,*ctxAB* 检测阳性。

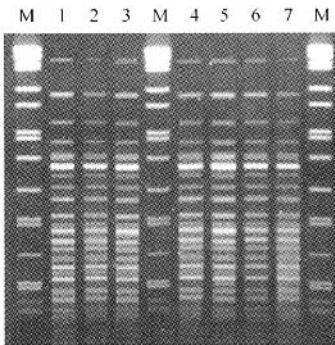
根据 BioNumerics 对 PFGE 带型的识别,对其中 67 株菌进行了相似性比较,这些菌株包括 1 株常规监测自江水中分离的 O139 群菌株且毒素基因检测为阴性,其余菌株来自暴发调查以及常规的环境和食品监测,且均为产毒株。上述 67 株菌被分成了 16 个型(表 1 和图 1、2)。

从各次暴发菌株的分型分析结果看,有如下特点:一是每起暴发中的分离菌株有各自的主要型别,在分离菌株较多的暴发中,第二起暴发以 3 型为主,第三起绝大多数菌株为 8 型,第五起以 12 型多见,第六起则以 5 型为多。这些暴发发生于不同地区和时间(从 7 月中旬至 9 月初),提示不同暴发之间是独立的事件。二是同起暴发中可有混合型别。有些暴发中型别较多(例如第五起暴发分离的 11 株菌中有 5 种型别),但又具有优势菌型(第五起的 11 株暴

表1 2004 年四川省 O139 群霍乱菌株来源、毒素基因检测以及 PFGE 型别

菌株号	分离地区	标本来源	毒力基因 <i>ctxAB</i>	PFGE 型别	菌株号	分离地区	标本来源	毒力基因 <i>ctxAB</i>	PFGE 型别
04017*	简阳	沱江水 [△]	-	-	04149	温江	患者 [●]	+	8
04019	简阳	沱江水 [△]	-	16	04134	温江	带菌者 [●]	+	8
04082*	简阳	沱江水 [△]	-	-	04139	温江	患者 [●]	+	8
04187*	双流	江安河河水 [△]	-	-	04144	温江	带菌者 [●]	+	8
04034	简阳	甲鱼 [△]	+	8	04147	温江	带菌者 [●]	+	8
04077	新都	甲鱼 [△]	+	7	04148	温江	带菌者 [●]	+	13
04078	新都	甲鱼 [△]	+	5	04150	青白江	厕所 [◇]	+	5
04079	新都	甲鱼 [△]	+	5	04151	双流	患者 [■]	+	8
04080	新都	甲鱼 [△]	+	8	04155	双流	患者 [■]	+	12
04081	新都	甲鱼 [△]	+	5	04156	双流	带菌者 [■]	+	12
04088	龙泉驿	患者 [▲]	+	14	04157	双流	患者 [■]	+	12
04089	龙泉驿	患者 [▲]	+	14	04158	双流	带菌者 [■]	+	12
04048	龙泉驿	医院排污口 [▲]	+	14	04159	双流	带菌者 [■]	+	9
04090*	双流	患者 [#]	+	-	04160	双流	带菌者 [■]	+	12
04091	双流	患者 [#]	+	3	04161	双流	带菌者 [■]	+	12
04092	双流	患者 [#]	+	1	04162	双流	带菌者 [■]	+	12
04093	双流	患者 [#]	+	2	04163	双流	带菌者 [■]	+	11
04094*	双流	患者 [#]	+	-	04164	双流	带菌者 [■]	+	10
04095	双流	患者 [#]	+	3	04168	广汉	患者 [☆]	+	5
04096	双流	患者 [#]	+	3	04169	广汉	患者 [☆]	+	8
04097	双流	患者 [#]	+	4	04170	广汉	患者 [☆]	+	5
04098	双流	厕所 [#]	+	3	04171	广汉	患者 [☆]	+	5
04101	双流	厕所 [#]	+	3	04172	广汉	患者 [☆]	+	8
04102	温江	患者 [●]	+	8	04173	广汉	患者 [☆]	+	5
04103	温江	患者 [●]	+	8	04174	广汉	患者 [☆]	+	6
04105	温江	患者 [●]	+	8	04176	广汉	患者 [☆]	+	15
04107	温江	带菌者 [●]	+	11	04178	广汉	患者 [☆]	+	5
04108	温江	患者 [●]	+	8	04179	广汉	患者 [☆]	+	5
04111	温江	患者 [●]	+	8	04180	广汉	患者 [☆]	+	5
04114	温江	患者 [●]	+	8	04181	广汉	患者 [☆]	+	5
04120	温江	带菌者 [●]	+	8	04182	广汉	患者 [☆]	+	8
04122	温江	带菌者 [●]	+	8	04183	广汉	患者 [☆]	+	5
04123	温江	患者 [●]	+	8	04184	广汉	患者 [☆]	+	5
04124	温江	患者 [●]	+	11	04185	广汉	患者 [☆]	+	5
04125	温江	带菌者 [●]	+	8	04186	广汉	带菌者 [☆]	+	8
04127	温江	患者 [●]	+	8	04188	绵阳	患者 [★]	+	8

* 未用 BioNumerics 进行聚类分析的菌株; △、▲、#、●、◇、■、☆、★分别表示为常规监测、第一至七起暴发



1: 菌株 04034 (甲鱼分离株); 2: 04111 (第三起暴发分离株); 3: 04151 (第五起暴发分离株); 4: 04080 (甲鱼分离株); 5: 04159 (第五起暴发分离株); 6: 04169 (第六起暴发分离株); 7: 04182 (第六起暴发分离株); M: 分子量标准 H9812

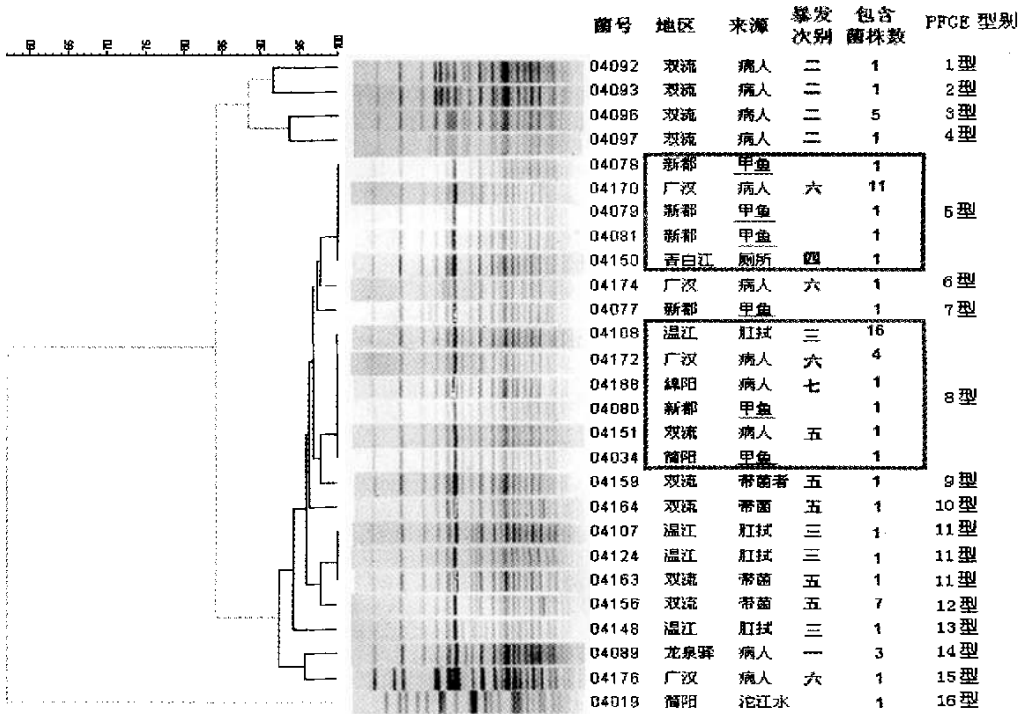
(同时列出了在第五和六起暴发中出现的菌株以及甲鱼中分离的菌株, 显示为同一型别)

图1 第三起霍乱暴发中优势菌型 PFGE 8 型图谱

发分离株中有 7 株属于 12 型)。另外同一型别可出现在不同的暴发中, 如 8 型出现在第三、五、六、七起暴发中(图 1), 只是在一些暴发中并不占优势。结果提示感染来源可能较为复杂, 但当时未获得食品或水的调查菌株, 尚不能做出明确结论。

自江水的常规监测中也分离到 O139 群菌株, 但为非产毒株, 且与这些暴发的分离菌株明显不同(图 2), 因此这些菌株是自然界中存在着的且与疫情无关。但另一些在暴发调查中来自厕所、医院排污口的分离株与当时暴发菌株的带型相同, 且为产毒株, 说明存在环境中致病菌株的污染。

从甲鱼中分离的 6 株菌均为产毒株, 这些菌株有三种 PFGE 型别, 其中两种(8 型和 5 型)与暴发菌株的带型相同, 另一种高度相似(相似系数高于 95%)。暴发中分离自患者的菌株多为 8 型和 5 型,



(其中“包含菌株数”表示同一个地区 *Not I* PFGE 电泳结果条带完全相同的菌株数量,方框内分别表示分型一致的两起暴发的优势菌型)

图2 霍乱暴发和环境及食品监测分离菌株的 PFGE 型聚类分析

与甲鱼分离株的带型相同,而流行病学调查发现聚餐中曾食用过甲鱼,提示甲鱼携带菌株与暴发之间有一定的关联。

讨 论

在霍乱的预防控制中,尤其在一个地区不断发生疫情时,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,以便采取有针对性的防治措施。但在霍乱暴发或流行中,很少能明确传染来源。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爆发性流行中致病微生物之间的相关性^[3-7],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、分析传播链,以此加强监控或阻断传播链,达到预防和控制疾病的目的。

病原菌基于基因水平的分子分型又称作细菌的“指纹图谱”分析,可以判断时间相近的不同爆发性流行事件(甚至散发病例)是来自同一传染源还是各自独立的暴发事件^[8],并对人群中病原传播进行早期分析与预警,这将直接影响到预防与控制策略的制订、实施以及实施的效果。基因分型包括质粒酶

切图谱分型、多位点酶电泳、限制性内切酶图谱分析、DNA 探针杂交技术、基于 PCR 的分型方法、PFGE 等。PFGE 分型技术因其结果能反映菌株全基因组遗传学特征,是目前分子生物学技术除基因测序外在重复性、特异性、分辨力、准确度上非常理想的方法之一^[9-14],尤其对于分析亲缘关系、追踪传染来源具有独特的优势,PFGE 分型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^[15]。

1. 甲鱼分离菌株与患者、带菌者分离菌株的带型相同,提示甲鱼带菌与人群聚餐暴发有关联。2004 年四川省在霍乱监测中从甲鱼分离出 O139 群霍乱弧菌,流行病学调查显示甲鱼均来自省内某一水产品批发市场。近两年 O139 群霍乱主要在该批发市场所处城市及周边市、县发生,且四川省数起疫情发生前均有宰杀和食用甲鱼史。在暴发分离的菌株中均有甲鱼分离菌株 PFGE 分型的 8 型和 5 型。8 型出现在第三起暴发中,在第五、六、七起暴发中少量菌株也为 8 型;5 型菌株为第六起暴发中的优势分离株,这些暴发疫情的聚餐中也食用过甲鱼。甲鱼多为炖食,加热时间长,一般在加工后不会带有

活菌。但在聚餐中,由于加工现场没有合格的卫生条件,生菜、熟菜加工不分,清洗没有流动水,清洗蔬菜和餐具不能严格分开,因此能造成相互污染。结合流行病学和实验室分析结果,推测四川省近两年 O139 霍乱聚餐暴发的主要模式为:携带霍乱弧菌的水产品(如甲鱼)→加工过程中污染餐、炊具或感染人群(如厨师带菌)→污染食品→聚餐暴发疫情。

2. 聚餐暴发 O139 霍乱疫情中出现混合菌型。例如第二起暴发疫情为同一起聚餐引发的食源性霍乱暴发,检测其中 8 株菌却分为 4 个型(其中 5 株菌为同一型别,3 株菌为另外三种型别)。我们分析可能是污染来源复杂,即因为聚餐而采购大批食品,其种类和数量较多,食品来源广,存在多种污染食品或同种食品多种污染的可能。另外,也需要考虑到其中有些可能是菌株变异引起,在一起暴发中的分离菌株、有些不同型别菌株间仅有个别带型的差异,相似度高。已知霍乱弧菌一些表型容易变异^[16,17],应考虑可能存在基因的变异。

3. 调查发现存在环境污染。在第二起暴发中,从疫点厕所分离到的产毒 O139 群菌株 PFGE 带型与同起暴发中的患者分离菌株相同;在第一起暴发的调查中,从收治患者的医院排污口分离到菌株,与同起暴发中患者分离菌株相同,显示产毒菌株已排放到周围环境中。因此对厕所粪便实行消毒处理是控制疫情扩散与蔓延的必要手段,患者接触物品和排泄物需要进行严格的消毒,医院收治霍乱患者后,其粪便或其他产生的垃圾如不经正确处理,菌株会随污水等排出医院,造成环境污染。

通过以上分析,我们认为四川省 O139 霍乱疫情中,甲鱼等水产品是疫情调查和预防控制的重点。一旦分离到霍乱弧菌应尽快进行毒力基因检测,以确定其危害性,并采取相应措施。目前霍乱在我国的暴发以食源性为主,应加强食品卫生的管理和宣传。此外,全国应有组织地开展霍乱病原学监测和相关信息交流,开展环境水体、尤其与人群生活接触密切的水体的监测。

参 考 文 献

氯霉素抗性基因标记及诱导. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004,24:253-257.

2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁,黎孟枫,译. 第 2 版. 北京:科学出版社,1999.

3 俞顺章,陈声林. 我国分子流行病学研究进展. 中华流行病学杂志,2000,21:383-386.

4 Tondo EC, Guimaraes MCM, Henriques JAP, et al. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. Can J Microbiol, 2000,46:1108-1114.

5 段广才,祁国明. 分子流行病学研究及其应用. 中华流行病学杂志,1993,14:118-121.

6 Garg P, Aydanian A, Smith D. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. Emerg Infect Dis, 2003,9:810-814.

7 Kahali S, Sarkar B, Rajendran K, et al. Virulence characteristics and molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. J Clin Microbiol, 2004,42:4111-4120.

8 王陇德. 现场流行病学理论与实践. 北京:人民卫生出版社, 2004. 231.

9 叶杨芹,马佳毓,付英梅,等. 脉冲凝胶电泳技术在肺炎克雷伯菌分型中的应用. 中国卫生检验杂志,2002,12:499-500.

10 康梅,申艳娜. PFGE 在医院内感染细菌的分子流行病学方面的应用. 华西医学,2002,17:573-574.

11 扈庆华,梁华坚,张顺祥,等. 核酸脉冲场电泳技术在霍乱分子流行病学调查中的应用. 现代预防医学,2002,29:568-569.

12 张磊,李萍. 脉冲凝胶电泳应用于医院感染阴沟肠杆菌的分子流行病学. 中华微生物学和免疫学杂志,2001,21:171-174.

13 蒋秀高,肖玉春,聂一新,等. 致病性钩端螺旋体脉冲凝胶电泳图谱分型研究. 中华微生物学和免疫学杂志,2001,21:378-381.

14 González-Rey C, Belin AM. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2003,26:25-35.

15 周晓明,卢林耿,卫国荣,等. 脉冲场电泳进行 *E. coli* O157 的分型. 复旦大学学报(医学科学版),2001,28:71-72.

16 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,2004,20:321-323.

17 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, 1997,35:1151-1156.

(收稿日期:2005-09-22)

(本文编辑:张林东)

1 刘广文,闫梅英,祁国明,等. 霍乱弧菌溶原性噬菌体 CTXΦ 的