

广东省 2007 年霍乱监测的病原特征分析

邓小玲 李柏生 谭海玲 孙立梅 柯碧霞 柯昌文 王多春 阙飙 钟豪杰

【摘要】 目的 分析 2007 年广东省霍乱弧菌分离株的病原学特征,比较不同地区流行优势菌型之间以及霍乱疫情分离株与常规监测分离株之间的克隆相关性。**方法** 对疫情与监测菌株进行常规生物分型,利用脉冲场凝胶电泳技术,分别对不同地区优势菌型稻叶型 1d 之间、霍乱疫情与常规监测中分离的相同型别菌株之间进行分子指纹图谱的相似性分析,探讨菌株间的相关性。**结果** 2007 年从广东省霍乱疫情中获得 31 株菌株,共 3 种血清型,优势菌型为 O1 群稻叶型 1d,不同地区病例的稻叶型 1d 菌株分子分型相似度在 94.5%~100% 之间;常规监测分离株 16 株,菌型分布散在,与疫情菌株的菌型分布一致性差,相同生物型的霍乱疫情与监测菌株同源性不高。**结论** 广东省 2007 年霍乱优势菌型稻叶型 1d 菌株为多克隆并存,显示为流行间歇期的特征。需利用分子分型技术开展分离株的分析,加强对流行的预警监测。

【关键词】 霍乱弧菌; 脉冲场凝胶电泳; 优势菌型

The etiologic characteristics of *Vibrio cholerae* in Guangdong province in 2007 DENG Xiao-ling*, LI Bo-sheng, TAN Hai-ling, SUN Li-mei, KE Bi-xia, KE Chang-wen, WANG Duo-chun, KAN Biao, ZHONG Hao-jie. *Guangdong Province Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China

【Abstract】 Objective To analyze the etiologic characteristics of *Vibrio cholerae* in Guangdong province in 2007. Genetic relationship was observed including among predominated biotype isolates from different areas within the province and among same biotypes isolates from cholera cases and regular surveillance. **Methods** Isolates from cholera cases and through environmental surveillance were typed by sero- and phage- typings. Similarity of molecular fingerprinting was analyzed through comparing the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) pattern of predominated biotype isolates, and those of the same biotype isolates from cholera cases and environment surveillance, respectively. In addition, genetic relationship was determined by clustering analysis, using bionumerics software. **Results** In total, 31 isolates from cholera cases were collected and subtyped for 3 serogroups. *V. cholerae* O1 El Tor Inaba phage 1d was the predominant biotype which causing most of the cases in Guangdong province in 2007. Data from cluster analysis showed that the similarity among Inaba phage 1d strains from different areas were from 94.5% to 100%. However, 16 isolates were collected from environment surveillance programs and the predominated biotype could not be found. Additionally, the biotype distribution of cases isolates was not consistent with those isolates through surveillance. High phylogenetic diversity was observed for the same biotypes isolates from cases and surveillance samples. **Conclusion** Our data showed that *V. cholerae* O1 El Tor Inaba phage 1d was the predominated biotype with multi-clone coexisting and circulating in Guangdong province in 2007. It also appeared to be the characteristics of cholera in the non-epidemic period, suggesting that it was necessary to enhance the alert surveillance programs for cholera epidemic based on the molecular typing techniques.

【Key words】 *Vibrio cholerae*; Pulsed field gel electrophoresis; Predominated biotype

第七次霍乱世界大流行在 1961 年出现后即在我国引起流行,近年来我国霍乱的流行出现某些新的病原特征^[1]。20 世纪 90 年代有 10 年没有造成

流行的 El Tor 稻叶型菌株,在 2001 年开始出现并成为当年霍乱流行的优势菌型。广东省因其地域特点一直是我国霍乱流行关注的地区,但近几年监测显示,广东省霍乱优势菌型不明显,不同流行之间存在菌型转换,进入了逐年波动性下降的低发时期。2005 年 El Tor 稻叶型菌株曾在我国多个省份引起流行,形成一个小的发病高峰,该菌型在广东省首先出现,并在引起局部暴发,而在 2006 年广东省和全

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2006AA02Z425);广东省医学科研指令性课题资助项目(C2007002)

作者单位:510300 广州,广东省疾病预防控制中心(邓小玲、李柏生、谭海玲、孙立梅、柯碧霞、柯昌文、钟豪杰);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(王多春、阙飙)

国霍乱病例均很少。2007 年广东省霍乱病例较 2006 年同期有所增加,在 2001 年之后以及 2005 年稻叶型菌株流行之后又出现以稻叶型流行株为主的优势菌型,值得关注。本研究对 2007 年广东省霍乱疫情监测与菌株病原学检测结果进行总结,重点分析作为 2007 年优势流行菌型的 El Tor 稻叶型菌株在不同地区之间的菌型同源性,探讨在疫情与监测中分离到的同型别菌株之间的相关性,旨在及时掌握广东省霍乱弧菌病原学特征,为制定霍乱防控提供依据。

材料与与方法

1. 菌株来源:本研究菌株 50 株,来自于广东省 2007 年霍乱疫情和常规监测,其中疫情相关菌株 31 株;按照《广东省霍乱监测方案(试行)》(粤卫[2005]62 号)在全省组织开展的水体、海水产品霍乱监测工作所分离的菌株 16 株;另 3 株 2005 年的广东省霍乱病例的优势分离株做比较分析。

2. 相关试剂和仪器:生化采用 API20 NE 鉴定系统,分型血清购自中国药品生物制品检定所,分型噬菌体 VP1~VP5 及第 IV 组噬菌体母液、各种繁殖宿主菌、溶源性检测指示菌和代表株均来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,各分型噬菌体经本实验室增殖至 10^9 pfu/ml 以上使用。Not I 限制性内切酶购自 NEB 公司,脉冲场凝胶电泳仪 CHEF Mapper 和 Gel Doc2000 凝胶成像分析仪为美国 BIO-RAD 产品。

3. 血清学分型、噬菌体-生物分型和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型:根据《霍乱防治手册》(卫生部疾病控制司,第 5 版),对相关菌株进行噬菌体生物分型以及产毒情况的检测;分别选取 2007 年优势菌型稻叶型 1d 菌株、疫情与监测均分离到的 O139 和小川 9k 菌株进行 PFGE 分子分型,参照美国疾病预防控制中心霍乱弧菌 PFGE 标准操作程序,采用 Not I 限制性内切酶进行酶切,用 BioNumerics 软件对 PFGE 图谱进行聚类分析。

结果

1. 霍乱疫情及常规监测菌株菌型分布:2007 年广东省共报告霍乱病例 28 例,涉及 5 个地级市(广州、深圳、中山、湛江和茂名),6 月 8 日出现全省首例霍乱病例,全年病例主要集中在 6-10 月,其中茂名市在 9 月发生一起食源性霍乱暴发疫情。

霍乱疫情中分离到 El Tor 型菌株 31 株,分别为 23 株稻叶型、5 株小川型(2 株 9k,5k,6c 和 1f 各 1 株)和 3 株 O139 群,其中所有的稻叶型 1d 菌株、1 株小川型 6c 和 1 株小川型 1f 为产毒株,其余的小川型和 O139 群菌株均为非产毒株。茂名市发生的一起聚餐疫情暴发均由稻叶型 1d 所致,广州市也以稻叶型 1d 为主,深圳市则以小川型为主。菌型呈散在分布(图 1)。常规水体和海水产品监测分离株 16 株,分别为 O1 群霍乱弧菌 6 株(3 株 5k,9k,9l 和 27l 各 1 株)、小川型 8 株(2 株 9k)和 1 株 O139 群霍乱弧菌,只发现 1 株小川型 3e 为产毒株。

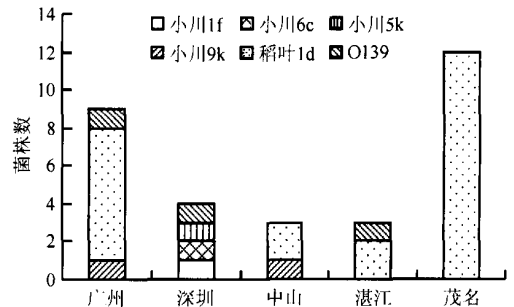


图1 2007年广东省霍乱疫情发生地区株菌型分布

图 2 显示,疫情和常规监测分离株的菌型分布并不一致,2007 年霍乱疫情的优势菌型为 O1 群 El Tor 稻叶型 1d,而监测菌株优势菌型不明显,各种型别分布较均匀。在疫情与常规监测中,均分离到一定数量的非产毒的小川型 9k、O139 群菌株。

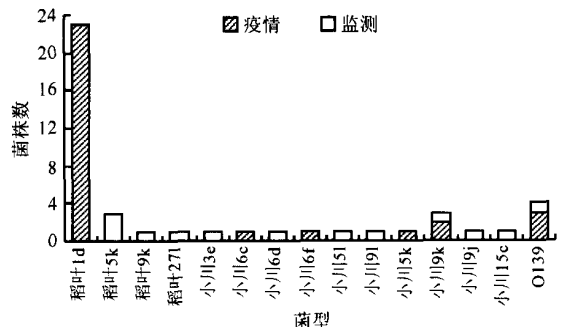


图2 2007年广东省霍乱疫情及常规监测菌株菌型分布

2. 霍乱疫情优势菌型(稻叶型 1d)分析:

(1) 同年不同地区稻叶型 1d 分析:2007 年从疫情暴发病例分离到稻叶型 1d 菌株,主要来自广州、湛江、中山和茂名市。采用 PFGE 分型方法,分析该型菌株在各地病例分离株之间的相似性。经聚类分析发现(图 3),总的相似率在 94.5%~100% 之间。相似度为 100% 的菌株分别位于 5 个主要分支:①湛江市 1 株菌(V07-60)、茂名市 2 株菌(V07-73 和 V07-74)聚在同一分支;菌株来源的 2 例茂名市患

者有共同进餐史,湛江市患者有进食海鲜史。②来自茂名市同一起聚餐暴发事件的菌株 V07-61~70,除 2 株(V07-62和V07-68)略有差别外,其余菌株带型一致。③带型相似度 100%的V07-48、V07-49菌株,来源于湛江和中山市各一例患者,流行病学追踪调查发现,发病前两人曾同处一室,为密切接触者。④相似度达 100%的V07-34、V07-35和V07-37菌株,分离自广州市的 3 例患者,其来源与流行病学调查资料一致。

相关性分析,结果显示(图 5、6):①O139 群感染病例分离株之间的同源性差,如湛江(V07-47)、深圳(V07-57)与广州(V07-036)病例 O139 群菌株间的 PFGE 带型相似度只有 86.6%;②外环境监测的 O139 群菌株之间的遗传关系相差甚远,如珠江水 O139 群分离株 V07-19、V07-7、V07-030、V07-12和V07-3之间的 PFGE 带型相似度在 68.4%~92.7%之间;③霍乱病例分离株与常规监测中分离的 O139 群菌株之间也未发现相似性。

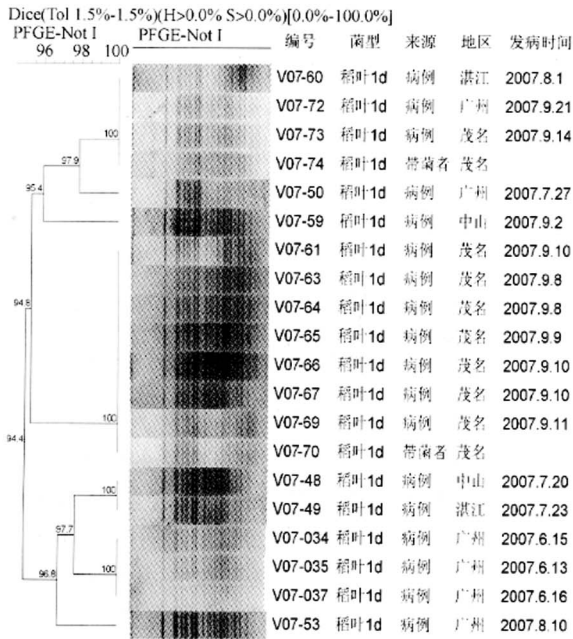


图3 2007 年广东省霍乱疫情分离的稻叶型 1d 菌株聚类分析

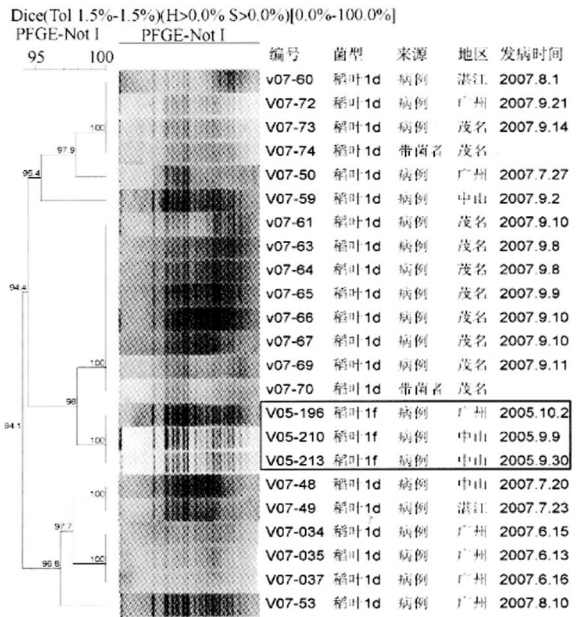


图4 2007 年广东省霍乱疫情中分离菌株稻叶型 1d 与 2005 年稻叶型 1f 菌株的聚类分析

(2)与 2005 年稻叶型 1f 菌株的比较分析:本实验室以往的研究发现^[2, 3],广东省 2001 年和 2002 年的优势菌型(分别为稻叶型 1d 和稻叶型 1f)具有相同的核糖体分型,尽管表型不同,但在分子水平上推测来自相同克隆系。为进一步分析 2007 年稻叶型 1d 菌株的分子特征,我们将 2007 年的稻叶型 1d 菌株与 2005 年的 3 株稻叶型 1f 菌株利用 PFGE 做比较分析,结果见图 4。从聚类分析发现,在 2007 年的稻叶型 1d 菌株中,只有茂名市的聚餐暴发事件菌株与 2005 年的稻叶型 1f 菌株相似性较高(带型相似度 98%),与其他的稻叶型 1d 菌株关联程度不大。

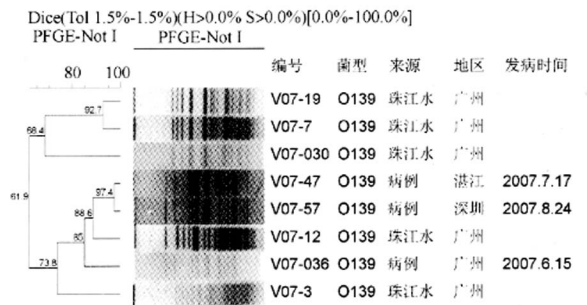


图5 2007 年广东省霍乱疫情和常规监测 O139 群分离菌株的聚类分析

3. 疫情暴发和常规监测分离到的 O139 群菌株和小川型 9k 菌株的相关性分析:对疫情和监测均分离到的 8 株 O139 群菌株和 4 株小川型 9k 菌株做 PFGE 分型,用 BioNumerics 软件对 PFGE 图谱进行

小川型 9k 的疫情分离株和监测分离株的情况类似,如广州(V07-032)和中山(V07-58)的小川型 9k 病例菌株之间、佛山市水体(V07-77)和珠江水(V07-55)的小川型 9k 监测菌株之间相似程度不大。

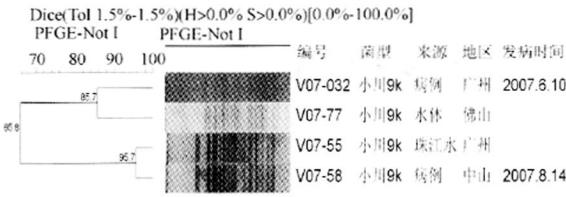


图6 2007 年广东省霍乱疫情和常规监测小川型 9k 分离菌株的聚类分析

讨论

回顾 1990 年以来广东省霍乱疫情和病原菌型变化,发现存在疫情波动和菌型转换现象。1990 - 2000 年流行优势菌型为 O1 群小川型,2001 年发生菌型变迁,转型为 O1 群稻叶型 1d,同年发生霍乱流行高峰;2002 年霍乱病例数下降,但优势菌型转为稻叶型 1f;2003、2004 年优势菌型不明显,出现多种菌型并存现象;2005 年优势菌型为稻叶型 1f;2006 年 3 例霍乱病例均由 O139 群菌株所致;2007 年尽管病例数不多,但病例菌型均为稻叶型 1d,且引起一起聚餐暴发疫情。鉴于稻叶型 1d 曾于 2001 年在广东省和 2005 年在福建省出现流行高峰,因而其出现值得高度关注。

对 2007 年稻叶型 1d 菌株的 PFGE 分型图谱聚类分析发现,在流行病学上有关联的病例菌株,其相似性达 100%,提示为同一克隆菌株引起的疫情暴发,如聚餐暴发疫情、湛江和中山两地的密切接触者发病,但无相同流行病学史的不同地区(广州、湛江和茂名)的病例菌株之间其相似度为 94.5% ~ 97.9%,提示广东省 2007 年稻叶型 1d 菌株为多克隆并存。对于湛江市分离菌株和 2 株茂名市分离菌株之间 PFGE 带型一致,又未发现有明显的共同暴露史,因该患者曾进食海鲜,提示应加强海产品的流行病学溯源追踪。

广东省在 2002 年和 2005 年的霍乱优势菌型为稻叶型 1f,本实验室曾对 2001 年和 2002 年两年的优势菌型(分别为稻叶型 1d 和稻叶型 1f)进行核糖体分型研究^[2,3],发现这两型菌株具有相同的核糖体型。研究还发现,2001 年出现的稻叶型菌株与 1980 年代的稻叶型 1d 及 1990 年代的小川型 1b 流行菌株具有不同的核糖体型,推测属于新的克隆系,因而引发当年霍乱流行高峰。与福建和浙江省 2005 年稻叶型流行菌株的基因组比较分析发现^[4],在其基因组岛 VSP II 中出现了特征性序列一致的

插入和缺失突变,该突变应是随机发生的,这似乎能反映新产生的一类霍乱致病菌株后,其在自然界和人群中高度扩散的能力,从而进一步证实出现新克隆群的设想。对广东省 2007 年的稻叶型 1d 与 2005 年的稻叶型 1f 菌株比较分析发现,两者相似程度不大,但 2007 年的聚餐暴发疫情菌株与 2005 年的稻叶型 1f 菌株相似性高(相似率 98%),是否来自同一克隆并产生了轻微的变异,与 2001 年的稻叶型 1d 菌株同源性如何,抑或具有 2005 年福建省的稻叶型 1d 菌株一样的基因组特征和高度的扩散能力,均还需要进一步研究。我们在以后的工作中,将加强对近年来稻叶型 1d 菌株的分子进化分析。

对广东省 2007 年霍乱疫情和常规监测分离菌株的生物分型发现,两者的菌型分布一致性差,2007 年霍乱疫情的优势菌型为 O1 群稻叶型 1d,而监测菌株各种型别分布散在,优势菌型不明显,这与 2005 年福建省的霍乱流行不同,该省疫情期间患者分离株与闽江水中的分离株菌型一致^[5],遗传关系高度相关。另外,广东省 2007 在疫情与常规监测中,均分离到一定数量的非产毒的小川型 9k 和 O139 群菌株,对其相关性分析显示,无论是 O139 群还是小川型 9k 菌株,其病例菌株之间、环境菌株之间或病例与环境的菌株相似程度均不高,同型菌株之间相似程度亦不高,显示出明显的克隆群多样化^[6]。

综上所述,通过对近年来广东省不同地区 E1 Tor 型霍乱弧菌分离株的 PFGE 分型比较,并根据不同年份的流行与散发规模,能够显示霍乱呈现多菌型的流行和局部暴发,不存在跨年度的流行扩散,表现为菌型多样、流行规模小的特点,这可能是流行间歇期的表现。

参考文献

- [1] 阙颖. 霍乱监测的新问题. 传染病信息, 2006, 19(1): 16-17.
- [2] 钟豪杰, 黎薇, 谭海玲. 广东省 2001 年 O1 群霍乱弧菌 RT 分型分析. 中国预防医学杂志, 2003, 4(增刊): 144-147.
- [3] 钟豪杰, 黎薇, 柯碧霞, 等. 广东省 2001-2004 年霍乱病原学分析. 中国预防医学杂志, 2005, 6(增刊 1): 94-99.
- [4] Pang B, Yan M, Cui Z, et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. J Bacteriol, 2007, 189(13): 4837-4849.
- [5] 王晓萍, 郭维植, 詹奎峰, 等. 2005 年福建省霍乱弧菌流行菌型特征分析. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 1965-1967.
- [6] 王多春, 王晓梅, 钟豪杰, 等. 珠江河口水体 O1 和 O139 群霍乱弧菌监测. 中华流行病学杂志, 2008, 29(2): 145-150.

(收稿日期: 2008-03-06)

(本文编辑: 张林东)