

## · 实验研究 ·

# 脉冲场凝胶电泳方法在霍乱暴发溯源中的应用

王鸣 李孝权 莫自耀 刘子飞 邓志爱 张欣强 沈纪川 张颖

**【摘要】** 目的 应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法对不同类型的霍乱暴发事件进行分析,了解霍乱菌株的 PFGE 特征,追溯菌株的来源及其演变过程,探讨霍乱暴发流行的特点和规律。方法 采用限制性内切酶 *Not I*,对2003-2005年广州地区霍乱暴发疫情中41株霍乱弧菌进行 PFGE 分子分型,用 BioNumerics Version 4.0 软件(复选 Dice 相关系数和 UPGMA 方法)进行聚类分析,并与噬菌体-生物分型及致病相关基因分型方法作比较。结果 在霍乱暴发事件中,PFGE 能有效地区分流行病学上密切相关菌株与无关菌株,与噬菌体-生物分型和致病相关基因分型方法相比具有更高的分辨能力。结论 PFGE 分型可揭示人和环境分离的霍乱菌株之间的流行病学联系,为霍乱疫情溯源提供分子流行病学证据和支持。

**【关键词】** 霍乱弧菌;脉冲场凝胶电泳;分子分型;噬菌体-生物分型

**Application of pulse-field gel electrophoresis analysis in the source-tracking of cholera epidemics** WANG Ming, LI Xiao-quan, MO Zi-yao, LIU Yu-fei, DENG Zhi-ai, ZHANG Xin-qiang, SHEN Ji-chuan, ZHANG Ying. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China  
Corresponding author: Wang Ming, Email: WangMing@gzcdc.org.cn

**【Abstract】 Objective** To apply pulse-field gel electrophoresis analysis (PFGE) in the analysis of cholera outbreak events and to determine the molecular epidemiological characteristics of *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) isolates. **Methods** PFGE using restriction enzyme *Not I* was employed in the molecular subtyping of forty-one strains of *V. cholerae* isolated in cholera outbreak events from 2003 to 2005 in Guangzhou area and PFGE patterns were analyzed by BioNumerics Version 4.0 software to perform cluster analysis. Pattern profiles were compared by utilizing of Dice coefficient and UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages). Comparison of PFGE typing results was performed with phage-biological typing and pathogenicity-associated genes typing. **Results** In cholera outbreak events, PFGE could discriminate epidemiologically related and unrelated strains, having more discriminatory power than phage-biological typing and pathogenicity-associated genes-typing. **Conclusions** Molecular sub-typing by PFGE could disclose the epidemiological relationships of strains from humans and the environment, providing molecular epidemiological evidence and support for the source-tracking of cholera outbreak events.

**【Key words】** *Vibrio cholerae*; Pulse-field gel electrophoresis analysis; Molecular subtyping; Phage-biological typing

广州地处珠江三角洲,常年发生霍乱散发病例或暴发流行。人群监测和外环境监测结果显示广州地区的霍乱弧菌菌型复杂,多种血清型(群)并存流行。现场流行病学调查方法通常难以揭示霍乱疫情中人与环境之间的关系。脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术使用切割频率较少的限制性内切酶对细菌全基因组 DNA 进行酶切,将大分子 DNA 片段分离,适用于分析流行病学事件中菌株之间的关系,

是溯源的有力工具<sup>[1-3]</sup>。本研究采用 PFGE 分子分型,结合噬菌体-生物分型、致病相关基因分型<sup>[4]</sup>和流行病学资料,对近年来广州地区发生的不同类型的霍乱暴发事件的菌株进行分析,探讨其分子流行病学特征和变化趋势。

## 材料与方 法

1. 细菌菌株:选择 2003-2005 年广州地区 5 起霍乱暴发事件中从病例和环境分离的霍乱弧菌代表菌株共 41 株,其中稻叶型 21 株,小川型 13 株, O139 群 7 株。41 株霍乱弧菌的致病相关基因分型

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2002059);广州市科技计划(2005J1-co191)

作者单位:510080 广州市疾病预防控制中心

通讯作者:王鸣,Email:WangMing@gzcdc.org.cn

采用多重 PCR 方法,检测霍乱弧菌的霍乱肠毒素 A 亚单位基因 (*ctxA*)、毒素共调菌毛亚单位 A 基因 (*tcpA*)、辅助霍乱肠毒素基因 (*ace*)、小带联结毒素基因 (*zot*) 4 种致病相关基因,方法及结果参见文献 [5,6],得到 3 种致病相关基因型,即致病相关基因 A 型 (*ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup> *ace*<sup>+</sup> *zot*<sup>+</sup> 型)、致病相关基因 B 型 (*ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> *ace*<sup>+</sup> *zot*<sup>+</sup> 型)和致病相关基因 C 型 (*ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> *ace*<sup>-</sup> *zot*<sup>-</sup> 型)。PFGE 相对分子质量 Marker 的标准菌株 *Salmonella serovar Braenderup* H9812 由 PulseNet China 提供。

2. 仪器和试剂:CHER Mapper 脉冲场凝胶电泳系统、Gel Doc 2000 凝胶成像系统均购自美国 BIO-RAD 公司, Bio photometer 购自 Eppendorf 公司;限制性内切酶 *Not* I 和 *Xba* I 为 NEB 公司产品,蛋白酶 K 为 Merck 产品, SeaKem Gold PFGE 级琼脂糖为美国 FMC 公司产品。

3. 脉冲场凝胶电泳分型:方法按照 PulseNet USA 对霍乱弧菌进行 PFGE 分子分型的快速标准实验室规程,略作改动。电泳完毕,将胶用 EB 溶液染色,脱色后用 Gel Doc 2000 拍摄图像,用 BioNumerics Version 4.0 软件对拍摄的图像进行处理和聚类分析。

### 结 果

用 BioNumerics 软件将 5 起霍乱暴发疫情的 41 株霍乱弧菌的 PFGE 图谱放在一起作聚类分析,按照菌株在聚类图中的先后顺序,采用阿拉伯数字赋予每一菌株相应的 PFGE 型别,如 PFGE 1 型、PFGE 2 型等,不同霍乱暴发事件相关菌株的 PFGE 分型特征分述如下。

1. 聚餐后霍乱暴发菌株特征:2005 年 9 月 9 日,海珠区 2 所小学和 1 所幼儿园的教职员工在某酒家聚餐后发生小川型霍乱暴发,共报告 43 例感染

者。对分离的 9 株霍乱弧菌作 PFGE 分析,其中 8 株具有相同 PFGE 型(PFGE 12 型),只发现 1 株(PFGE 13 型)在 125 kb 处增加 1 条带,相似性系数为 98% (图 1)。

2. 水型暴发霍乱菌株特征:2005 年 9 月至 12 月,位于珠江入海口的南沙区发生水型霍乱(稻叶型)暴发,出现 37 例霍乱感染者,疫情分 3 个波次发生:第一波从 9 月 19 日开始,2 周内出现 11 例感染者;第二波从 10 月中下旬开始,出现 14 例感染者;第三波从 11 月 6 日开始的 1 个月内出现 12 例感染者。用 PFGE 方法对 13 株病例分离株和 1 株疫点河涌水分离株(图 2)进行分析,显示 2 种高度相近的 PFGE 型。其中 7 株病例分离株具有相同 PFGE 型(11 型),为第一波优势克隆型;另有 7 株菌(包括 1 株河涌水分离株)同为 PFGE 10 型,为第二、三波优势克隆型。上述 14 株菌株致病相关基因分析均为 A 型。

值得注意的是,在与以上疫点只有一堤之隔的外海水中分离到的 1 株 PFGE 14 型的稻叶型菌株(致病相关基因 C 型),与暴发菌株的带型差异达 10 条以上,相似性系数只有 81%。

3. 食源性霍乱暴发菌株特征:2003 年 8 月,某装饰材料店 21 名员工在某酒家聚餐后发病,从 1 名装饰材料店员工(病例)肛拭检出小川型 19k 霍乱弧菌,从 3 名酒家员工(均为带菌者)肛拭和该酒家海鲜池的养殖水及购自黄沙水产市场的虾中分别检出小川型 19l 霍乱弧菌。用 PFGE 对病例、1 例带菌者、养殖池水和虾的分离株进行分型,这 4 株菌具有相同 PFGE 型(15 型),且均为致病相关基因 C 型菌(图 3)。

4. 境外输入性霍乱暴发菌株特征:2004 年 4 月,广州发生一起泰国输入性旅行者霍乱暴发疫情,4 例病例和 2 例带菌者来自同一个旅游团,在泰国期间均进食过鱼虾蟹等海水产品和多种水果。从 6

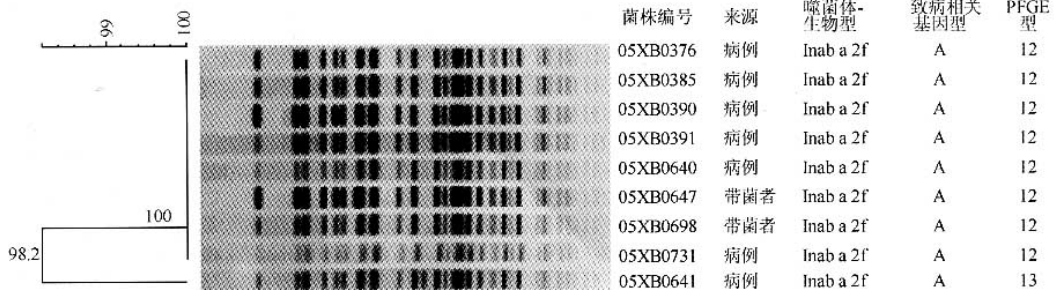


图1 2005 年广州市某人群聚餐后霍乱暴发菌株的 PFGE 聚类分析图

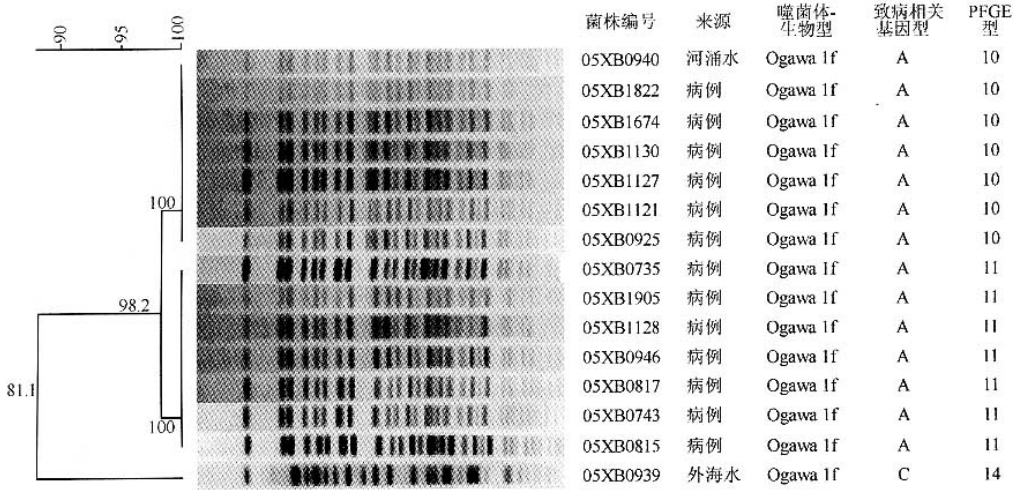


图2 2005 年广州市水型霍乱暴发菌株的 PFGE 聚类分析图

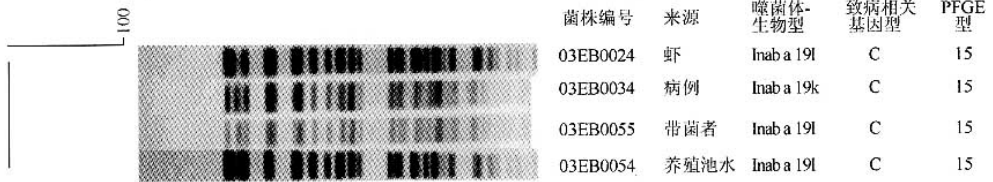


图3 2003 年广州市食源性霍乱暴发菌株的 PFGE 聚类分析图

例感染者分离的稻叶型霍乱弧菌中,PFGE 7 型为 4 例,8 型和 9 型各 1 例。与优势菌株的 PFGE 7 型株相比,PFGE 9 型株在 320 kb 缺失 1 条带,相似性系数为 98%;PFGE 8 型株在 123 kb 增加 1 条带,相似性系数同为 98% (图 4)。

5. 列车内霍乱暴发菌株特征:2003 年 7 月 2 日,某班列车一名乘务员发生腹泻、呕吐等症状,实验室诊断为 O139 群霍乱弧菌感染,在随后的调查

中发现该班列车乘务员中另有 6 名为感染 O139 群霍乱弧菌的带菌者,其中 1 人为餐车的炊事员,1 周前曾吃过田螺等海产品并出现过一次腹泻。经 PFGE 聚类分析发现,7 株 O139 群霍乱菌株存在 6 种 PFGE 型,病例分离株为 PFGE 1 型,6 例带菌者分离株分布于 2~6 型。以病例分离株的 PFGE 1 型作为参照型,2~6 型的带菌者分离株与 1 型分别相差 1、1、3、2、4 条带 (图 5)。

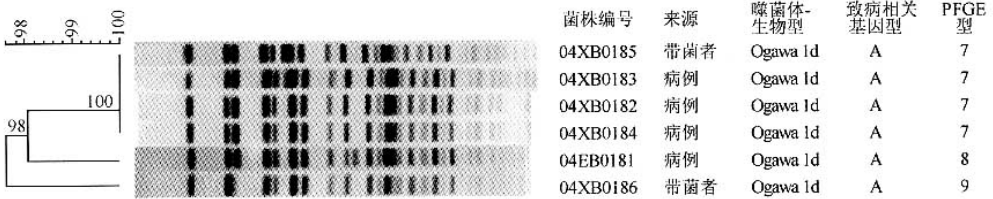


图4 2004 年境外输入性霍乱暴发菌株的 PFGE 聚类分析图



图5 2003 年某列车内霍乱暴发菌株的 PFGE 聚类分析图

## 讨 论

在霍乱疫情的流行病学调查中,溯源通常是重点。传统的血清学分型方法难以阐明霍乱菌株之间的流行病学联系;噬菌体-生物分型方法虽然可以鉴定流行株与非流行株,但其应用范围只局限于 O1 群的霍乱菌株,而不能应用于非 O1 群的菌株;近年来发展起来的霍乱弧菌致病相关基因检测技术为分子水平的溯源提供了新的手段,但也不能分辨菌株间内在的生物学联系;PFGE 分型方法与上述方法相结合<sup>[7-9]</sup>,则能更全面、准确地揭示霍乱菌株内在联系的特点。

1. 在点状暴发中 PFGE 型具有高度的一致性。如“教师节”在某酒家聚餐后发生的霍乱疫情,是典型的一次性暴露后引起的暴发事件,对从感染者分离的 9 株霍乱弧菌作 PFGE 分析,相似性系数为 98%,提示所有的感染为同一克隆来源,噬菌体-生物分型和致病相关基因分型的结果也与此相符。

2. 能有效地区别与暴发疫情相关的菌株与无关菌株。如发生在南沙区的水型暴发疫情,从内河(河涌)里分离的菌株与感染者分离的菌株归属于高度相近的 PFGE 10 型和 11 型,致病相关基因也同为 A 型,说明暴发与河涌水污染密切相关。而同期从只有一堤之隔的外海水分离的菌株为 PFGE 14 型,与感染者及河涌水分离菌株的带型差异达 10 条以上,且致病相关基因为 C 型,由此可判断外海水的菌株与疫情暴发无关系。

3. 可进行暴发疫情的溯源。2003 年天河区某酒家发生霍乱暴发,从病例、带菌者、酒家养殖水和供货的黄沙水产市场的虾中检出小川型 19k 和 19l 两种不同噬菌体-生物型的霍乱弧菌。但 PFGE 分型和致病相关基因检测,均提示这起暴发疫情的源头极有可能来自黄沙水产市场的水产品。

4. 可根据 PFGE 分型推测菌株的流行病学联系。在泰国输入性旅行者霍乱暴发疫情和列车内霍乱暴发疫情两起事件中都有一个共同的特点,就是菌株 PFGE 型分布范围较大,分别出现 3 种和 6 种不同的 PFGE 型,而且有多条带型差异,相似性系数分别为 97% 和 89%,且每起疫情中菌株的噬菌体-生物分型和致病相关基因分型结果是相同的,提示这些菌株之间有密切的生物学关系。

5. 对菌株的演变具有更敏感的分辨能力。噬菌体-生物分型、致病相关基因分型虽然可以分析霍乱菌株的同源关系,但 PFGE 仍可继续分为不同的型别,比噬菌体-生物分型、致病相关基因分型方法能

更细致地观察菌株的生物学演变过程。如在南沙区的水型暴发事件中,疫情呈现出 3 个波次,第一波的菌株为 PFGE 11 型,第二、三波疫情的菌株已转变为 PFGE 10 型,两者 PFGE 型的差别只有一个电泳带。这表明,菌株在人与环境相互作用的过程中,尽管其噬菌体-生物型和致病相关基因型没有发生变化,但 PFGE 方法已观察到了其分子水平发生的变化。

另一方面,PFGE 分型方法也存在不足,在某些情况下不能完全依赖 PFGE 技术来分析霍乱菌株的流行病学联系,而应结合其他分型方法,甚至包括血清分型方法,因为从更多霍乱菌株的 PFGE 分型结果来看(资料未显示),即使聚为一类的具有高度相近 PFGE 型的霍乱弧菌也可能属于不同的噬菌体-生物型和(或)不同的致病相关基因型,甚至不同的血清型。因此,PFGE 分子分型方法必须与传统分型和其他分子分型方法及流行病学资料紧密结合,才能客观、科学地分析菌株分型的流行病学联系和意义<sup>[10]</sup>。

(感谢深圳市疾病预防控制中心张顺祥副主任、扈庆华主任、何建凡主任、兰全学硕士、石晓路硕士、王冰医生在实验过程中给予的帮助和指导)

## 参 考 文 献

- [1] Arakawa E, Murase T, Matsushita S, et al. Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular comparison of *Vibrio cholerae* O1 isolates from domestic and imported cases of cholera in Japan. J Clin Microbiol, 2000, 38: 424-426.
- [2] Kam KM, Luey CK, Tsang YM, et al. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 by pulsed-field gel electrophoresis in Hong Kong: correlation with epidemiological events from 1994 to 2002. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4502-4511.
- [3] Mahalingam S, Cheong YM, Kan S, et al. Molecular epidemiologic analysis of *Vibrio cholerae* O1 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 1994, 32: 2975-2979.
- [4] 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. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 910-921.
- [5] 李孝权, 王鸣, 易鸿, 等. O139 群霍乱弧菌地方分离株的分子特征研究. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21: 608-610.
- [6] 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点分析. 中华预防医学杂志, 2006, 40: 47-51.
- [7] Islam MS, Talukder KA, Khan NH, et al. Variation of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Bangladesh and its correlation with the clinical strains. Microbiol Immunol, 2004, 48: 773-777.
- [8] Cameron DN, Khambaty FM, Wachsmuth IK, et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol, 1994, 32: 1685-1690.
- [9] Matsumoto M, Suzuki M, Hiramatsu R, et al. Epidemiological investigation of a fatal case of cholera in Japan by phenotypic techniques and pulsed-field gel electrophoresis. J Med Microbiol, 2002, 51: 264-268.
- [10] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2233-2239.

(收稿日期: 2006-07-26)

(本文编辑: 王多春)