

## · 实验室研究 ·

# 上海市1962—2011年霍乱弧菌表型特征及分子分型研究

屠丽红 陈敏 李伟 张曦 陈洪友 王文静

**【摘要】** 目的 分析1962—2011年上海市霍乱弧菌的表型及分子分型特征。方法 采用WHO推荐的改良K-B纸片法,对222株霍乱弧菌进行11种抗菌药物(头孢曲松、强力霉素、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、丁胺卡那霉素、四环素、氯霉素、萘啶酸、氨苄西林、庆大霉素)敏感试验。以PCR检测霍乱毒素基因(*ctxA*)、小带联结毒素基因(*zot*)、辅助霍乱肠毒素基因(*ace*)、溶血素基因(*hlyA*)、毒素协调菌毛基因(*tcpA*)、外膜蛋白基因(*ompU*)和调控蛋白基因(*toxR*)。采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法对菌株进行分子分型,用BioNumerics软件分析电泳图谱。结果 222株霍乱弧菌经药物敏感试验分析显示,1962—1996年的菌株对多种药物敏感,2005—2011年的菌株对多种药物耐药。O139群耐药率明显高于O1群,O139群产毒株的耐药率比非产毒株高。毒力基因分析显示,1962—1996年霍乱患者来源菌株多为O1群产毒株,2005—2011年患者来源菌株多为O139群产毒株,水体来源菌株未检出*ctxA*基因,O1群水产来源菌株以*hlyA*<sup>+</sup>*toxR*<sup>+</sup>*ompU*<sup>+</sup>为主,占25.6%(11/43),O139群水产来源菌株以*hlyA*<sup>+</sup>*toxR*<sup>+</sup>*ompU*<sup>+</sup>*ctxA*<sup>+</sup>*ace*<sup>+</sup>*zot*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>为主,占76.1%(16/21)。PFGE分析将222株菌分为121个PFGE型,O139群分为3个聚类,O1群分为5个聚类。结论 上海市霍乱弧菌随着时间推移表型及分子特征均发生了很大变化,耐药情况加重。

**【关键词】** 霍乱弧菌;表型;分子分型;脉冲场凝胶电泳

**Characterization of phenotype and molecular characteristics on *Vibrio cholerae* strains isolated in Shanghai, 1962–2011** TU Li-hong<sup>1,2</sup>, CHEN Min<sup>2</sup>, LI Wei<sup>3</sup>, ZHANG Xi<sup>2</sup>, CHEN Hong-you<sup>2</sup>, WANG Wen-jing<sup>4</sup>. 1 College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China; 2 Department of Microbiology, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention; 3 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 4 Department of Public Health and Molecular Biology, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: WANG Wen-jing, Email: wjwang@scdc.sh.cn

This work was supported by grants from the Excellent Academic Leaders of Shanghai Health Field (No. XBR2011051) and the Public Health Key Disciplines in Shanghai-Health Microbiology (No. 12GWZX0801).

**【Abstract】 Objective** To describe the phenotype and molecular characteristics of *Vibrio* (*V.*) *cholerae* strains isolated in Shanghai, from 1962 to 2011. **Methods** K-B test was used to investigate the antibiotic resistance of *V. cholerae* strains. PCR was applied to detect seven virulence-related genes including cholera toxin (*ctxA*), zonula occludens toxin (*zot*), accessory cholera enterotoxin (*ace*), hemolysin (*hlyA*), toxin-coregulated pilus (*tcpA*) outer membrane protein (*ompU*) and the regulatory protein genes (*toxR*). Genetic relation was assessed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and the patterns were clustered by BioNumerics software. **Results** *V. cholerae* strains isolated from 1962 to 1996 were sensitive to most of the antibiotics. However, the strains isolated from 2005 to 2011 were resistant to many antibiotics. *V. cholerae* O139 group showed higher prevalence of resistance to several antibiotics compared with O1 group, and the resistance rate of the O139 toxigenic isolates was higher than that of the non-toxigenic isolates. Most of the O1 strains isolated from 2005 to 2011 were non-toxigenic while O139 strains isolated from 2005 to 2011 were almost toxigenic. There were no strains of *ctxA*<sup>+</sup> detected from the rivers from 2005 to 2011. Main gene type of the O1 strains detected from the aquatic products was *hlyA*<sup>+</sup>*toxR*<sup>+</sup>*ompU*<sup>+</sup>, while that of the O139 strains was *hlyA*<sup>+</sup>*toxR*<sup>+</sup>*ompU*<sup>+</sup>

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.08.015

基金项目:新一轮上海市卫生系统优秀学科带头人计划(XBR2011051);上海市公共卫生重点学科卫生微生物学(12GWZX0801)

作者单位:201620 上海,东华大学化学化工与生物工程学院(屠丽红);上海市疾病预防控制中心微生物实验室(屠丽红、陈敏、张曦、陈洪友);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(李伟);上海市疾病预防控制中心公共卫生分子生物研究室(王文静)

通信作者:王文静, Email: wjwang@scdc.sh.cn

*ctxA*<sup>+</sup>*ace*<sup>+</sup>*zot*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>. Using PFGE, 222 *V. cholerae* strains were subtyped into 121 molecular types. O139 strains were divided to three clusters and O1 strains to five clusters. **Conclusion** The characteristics of *V. cholerae* strains isolated in Shanghai from 1962 to 2011 showed great changes, suggesting that more attention should be paid to the multiplication on antibiotic resistance of *V. cholerae* strains.

**【Key words】** *Vibrio cholerae*; Phenotype; Molecular type; Pulsed-field gel electrophoresis

霍乱弧菌是一种革兰阴性细菌,根据 O 抗原的不同分为 206 个血清群, O1 和 O139 群产毒株是引起霍乱流行的主要血清型菌株<sup>[1]</sup>, O1 群分为 3 个血清型:小川、稻叶及彦岛型。霍乱弧菌致病基因主要包括霍乱毒素基因(*ctxA*)和毒素协调菌毛基因(*tcpA*)及相关调控基因小带联结毒素基因(*zot*)、辅助霍乱肠毒素基因(*ace*)、溶血素基因(*hlyA*)、外膜蛋白基因(*ompU*)和调控蛋白基因(*toxR*)等<sup>[2,3]</sup>。

我国已出现 3 次霍乱流行高峰(分别出现在 20 世纪 60 年代、80 年代和 90 年代),自 2002 年开始流行处于低谷<sup>[4]</sup>。本研究收集 1962—2011 年上海市的 222 株霍乱弧菌,分析其药物敏感性、毒力基因,并运用脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法分析霍乱弧菌的表型特征及分子分型。

**材料与方 法**

1. 菌株来源及鉴定:霍乱菌株来源于上海市菌毒种保藏中心,从 1962—2011 年检出的 3000 多株菌株中随机选择流行背景清楚的 222 株,所有菌株按照 WS 289-2008《霍乱诊断标准》鉴定为霍乱弧菌,同时进行血清分型(表 1)。

2. 主要试剂及仪器设备:霍乱弧菌诊断血清购自中国药品生物制品检定所;药敏纸片、MH 琼脂购自英国 Oxoid 公司;限制性内切酶 *Xba* I、*Not* I、100 bp DNA Ladder Marker、Taq Premix、琼脂糖购自宝生物工程(大连)有限公司;Seakem Gold 低熔点琼脂糖购自美国 Cambrex Bio Science Rockland 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。主要仪器包括 PCR 基因扩增仪(Bio-Rad DNA Engine Dyad)、脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad CHEF Mapper)、凝胶成像系统(Bio-Rad GEL Doc2000)。引物序列由上海生工生物工程有限公司完成。

3. 药物敏感试验:采用 WHO 推荐的改良 K-B

纸片法。抗菌药物包括头孢曲松、强力霉素、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、丁胺卡那霉素、四环素、氯霉素、茶啶酸、氨苄西林、庆大霉素。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 为上海市疾病预防控制中心实验室提供,结果判断按照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)标准。

4. 毒力基因检测:菌株 37 ℃ 培养过夜,使用细菌基因组 DNA 试剂盒提取基因组 DNA, -20 ℃ 保存。对 222 株霍乱弧菌进行 7 种毒力基因分析,引物序列见表 2。扩增条件:94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 1 min, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 4 min。扩增产物经电泳后于凝胶成像系统中观察结果。

5. PFGE 实验:按照 PulseNet 监测网络中霍乱弧菌 PFGE 标准分型方法(*Not* I 酶切)<sup>[5]</sup>。PFGE 图像应用 BioNumerics 软件(Version 6.0, Applied Maths)处理,聚类方法采用非加权组平均法(UPGMA)。

**结 果**

1. 药物敏感试验:222 株霍乱弧菌经 11 种抗菌药物敏感性试验检测结果显示,1962—1996 年的 O1 群菌株对 10 种药物均表现为敏感(100.0%),只对氨苄西林部分耐药(耐药率 < 10.0%); 2005—2011 年 O1 群菌株对强力霉素、诺氟沙星、复方新诺明、丁胺卡那霉素、四环素、氯霉素、茶啶酸、氨苄西林、庆大霉素有不同程度的耐药。1994—1996 年的 O139 群霍乱弧菌对复方新诺明、氯霉素、氨苄西林部分耐药, 2005—2011 年的 O139 群霍乱弧菌对强力霉素、复方新诺明、四环素、氯霉素、茶啶酸、氨苄西林、庆大霉素耐药率高。O139 群耐药率比 O1 群高(表 3)。O139 群产毒株耐药率比非产毒株高。

2. 毒力基因特征:对 222 株霍乱弧菌进行毒力基因分析, O1 和 O139 群菌株均含有 *hlyA*、*toxR*。O1 群患者来源菌株中 58.6%(41/70)含有 7 个毒力基

表 1 1962—2011 年 222 株霍乱弧菌来源及血清分型

标本来源	1962—1976 年		1977—1989 年		1990—1996 年			2005 年			2006—2011 年			合计
	O1		O1		O1		O139	O1		O139	O1		O139	
	小川	稻叶	小川	稻叶	小川	稻叶		小川	稻叶		小川	稻叶		
患者	22	1	6	11	14	5	4	0	3	19	5	3	14	107
水体	19	1	1	0	3	1	0	1	0	0	13	7	5	51
水产	0	0	0	0	0	0	0	7	4	9	15	17	12	64
合计	41	2	7	11	17	6	4	8	7	28	33	27	31	222

注:由于 1997—2004 年菌株无保藏,故为空缺

表 2 霍乱弧菌毒力及调控基因引物

目的基因	引物序列(5' ~ 3')	扩增长度 (bp)	参考文献
ctxA	FP CGGGCAGATTCTAGACCTCTCG	564	[6]
	RP CGATGATCTTGAGCATTCCAC		
zot	FP TCGCTTAACGATGGCGGTTTT	947	[7]
	RP AACCCCGTTTCACTTCTACCCA		
ace	FP TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC	316	[7]
	RP CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG		
tcpA	FP CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	453	[7]
	RP CGAAAGCACCTTCTTTCACACGTTG		
hlyA	FP GAGCCGGCATTCATCTGAAT	481	[8]
	RP CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA		
toxR	FP CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC	779	[8]
	RP AGGGTTAGCAACGATGCGTAAAG		
ompU	FP ACGCTGACGGAATCAACCAAAG	869	[8]
	RP GCGGAAGTTTGGCTTGAAGTAG		

表 3 1962—2011 年 O1 和 O139 群霍乱弧菌耐药率比较

药 物	1962—1996 年		2005—2011 年	
	O1 (n=84)	O139 (n=4)	O1 (n=75)	O139 (n=59)
头孢曲松	0	0	0	0
强力霉素	0	0	9.3	72.8
诺氟沙星	0	0	6.7	0
环丙沙星	0	0	0	0
复方新诺明	0	25.0	17.3	76.3
丁胺卡那霉素	0	0	10.7	0
四环素	0	0	10.7	61.0
氯霉素	0	25.0	13.3	55.9
萘啶酸	0	0	20.0	79.7
氨苄西林	8.3	75.0	18.7	62.7
庆大霉素	0	0	6.7	39.0

因, O139 群患者来源菌株中 86.5% (32/37) 含有 7 个毒力基因。1962—1996 年水体来源 O1 群菌株 12.0% (3/25) 含有 ctxA 基因, 2005—2011 年水体来源 O1 群菌株未检出 ctxA 基因, 水产来源 O1 群菌株以 hlyA<sup>+</sup>toxR<sup>+</sup>ompU<sup>+</sup> 为主, 占 25.6% (11/43), 水产来源 O139 群菌株以 hlyA<sup>+</sup>toxR<sup>+</sup>ompU<sup>+</sup>ctxA<sup>+</sup>ace<sup>+</sup>zot<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> 为主, 占 76.1% (16/21) (表 4)。

3. PFGE 分型: 对 222 株霍乱弧菌进行 PFGE 分

型 (Not I 酶切), 共分为 121 个型别。63 株 O139 群菌株 PFGE 带型相似度范围为 70.0% ~ 100%, 分成 3 个聚类 (I ~ III) (图 1), 非产毒株中 5 株 PFGE 带型完全一致, 产毒株指纹图谱相似度为 88.4% ~ 100%。O1 群产毒株以及具有 ≥ 2 株相同带型非产毒株的 PFGE 相似度范围在 75.3% ~ 100%, 分为 5 个聚类 (I ~ V) (图 2)。产毒株分为聚类 I、II, 非产毒株分为聚类 III ~ V。

讨 论

本研究结果显示, 2005—2011 年霍乱弧菌耐药谱相对于 1996 年前明显变宽, 主要对强力霉素、复方新诺明、四环素、氯霉素、萘啶酸、氨苄西林、庆大霉素产生耐药, 这可能是抗生素的选择压力所致<sup>[9]</sup>。所有菌株对头孢曲松、环丙沙星敏感性高, 两者可作为临床治疗霍乱的首选药物, 但是也有研究发现霍乱弧菌对环丙沙星发生耐药<sup>[10, 11]</sup>, 因此需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。

毒力基因检测结果显示, 1962—1996 年霍乱大流行期间水体中存在产毒株, 2005—2011 年水体中未检出产毒株, 因此在上海市经水感染霍乱的可能性较小。多种水产品中检出霍乱弧菌产毒株, 与已有研究结果一致<sup>[12, 13]</sup>, 上海市多起霍乱疫情由食入不洁食物引起<sup>[14]</sup>, 因此应进一步加强对水产品的监测。2005 年后患者及水产品中多检出 O139 群产毒株 (携带 7 种毒力相关基因), 因此有必要加强对 O139 群的监测, 防止其引起大流行。水体和水产中检出的 O1 群霍乱弧菌多为非产毒株, 其毒力基因特征多样, CTX 基因元件上存在缺失, 应注意进行监测, 以免基因重组使其重获毒力, 从而造成霍乱流行。

本研究结果显示, 1962—2011 年霍乱弧菌产毒株间 PFGE 指纹图谱相似度高, 仅有 4 ~ 6 条的条带

表 4 1962—2011 年 O1 和 O139 群霍乱弧菌毒力基因特征

毒力基因特征	1962—1996 年			2005—2011 年					
	O1		O139	O1		O139			
	患者 (n=59)	水体 (n=25)	患者 (n=4)	患者 (n=11)	水体 (n=21)	水产 (n=43)	患者 (n=33)	水体 (n=5)	水产 (n=21)
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup> ctxA <sup>+</sup> ace <sup>+</sup> zot <sup>+</sup> tcpA <sup>+</sup>	36(61.0)	3(12.0)	1(25.0)	5(45.5)	0	4(9.3)	31(93.9)	0	16(76.1)
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup> ace <sup>+</sup> zot <sup>+</sup> tcpA <sup>+</sup>	0	1(4.0)	0	0	2(9.5)	9(20.9)	0	0	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup> ace <sup>+</sup> tcpA <sup>+</sup>	2(3.4)	0	0	0	0	2(4.7)	0	0	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup> ace <sup>+</sup> zot <sup>+</sup>	2(3.4)	2(8.0)	0	0	2(9.5)	2(4.7)	0	0	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup> tcpA <sup>+</sup>	3(5.0)	3(12.0)	0	3(27.2)	4 (19.0)	10(23.2)	0	0	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup> zot <sup>+</sup>	2(3.4)	2(8.0)	0	0	0	0	0	0	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ompU <sup>+</sup>	9(15.4)	4(16.0)	0	2(18.2)	12(57.2)	11(25.6)	0	2(40.0)	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup> ace <sup>+</sup>	3(5.0)	1(4.0)	0	0	0	0	0	0	0
hlyA <sup>+</sup> toxR <sup>+</sup>	2(3.4)	9(36.0)	3(75.0)	1(9.1)	1(4.8)	5(11.6)	2(6.1)	3(60.0)	5(23.9)

注: 括号外数据为菌株数, 括号内数据为构成比 (%)

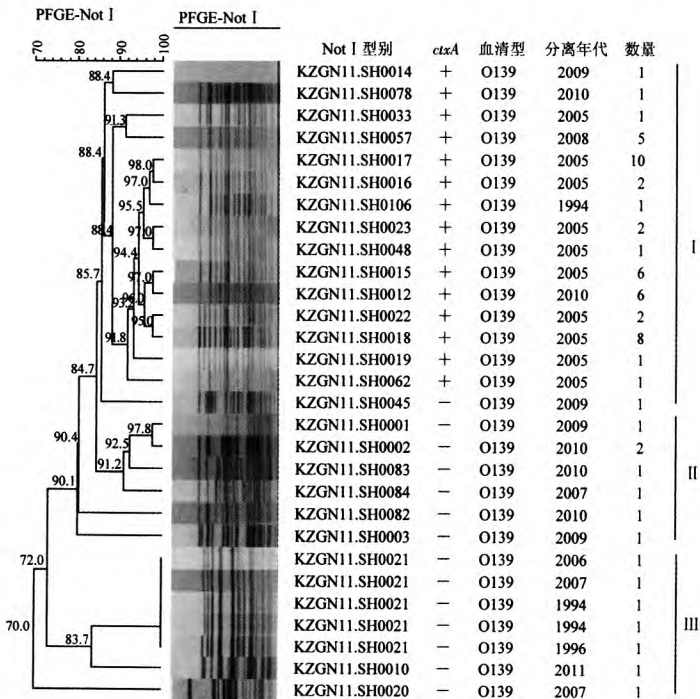


图1 O139群霍乱弧菌PFGE分型

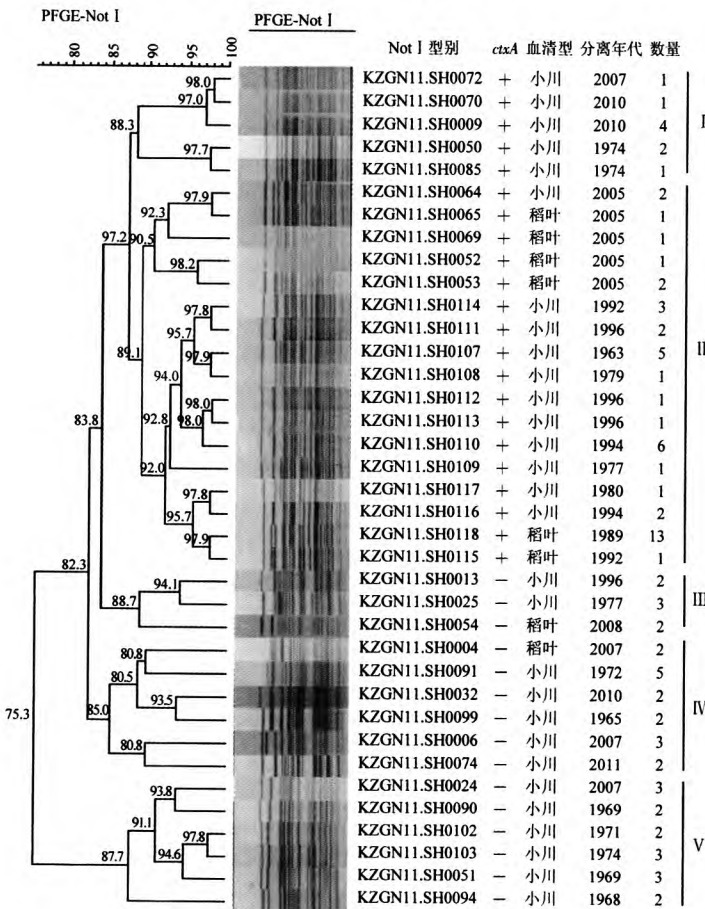


图2 O1群产毒株及部分非产毒株PFGE分型

差异,而非产毒株PFGE指纹图谱有≥6条的条带差异,菌株无相关性。PFGE分析显示流行高峰期的菌株与非流行期内检出的产毒株分子分型相似,提示

菌株亲缘关系近。其中分离于患者的产毒株PFGE指纹图谱与水产来源菌株一致,提示被污染的水产品可能是致病原。

参考文献

- [1] The Department Disease Control of Ministry of Health of China. Cholera Prevention and Control of Manual (the fifth Edition). 1999. (in Chinese) 卫生部疾病控制司. 霍乱防治手册. 5版. 1999.
- [2] Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science, 1996, 272(5270): 1910-1914.
- [3] Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, et al. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3134-3139.
- [4] Kan B. Cholera monitoring new problems. Infect Dis Inform, 2006, 19(1): 16-17. (in Chinese) 阚斌. 霍乱监测的新问题. 传染病信息, 2006, 19(1): 16-17.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention. Rapid Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Vibrio cholerae* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2006.
- [6] Fields PI, Popovic T, Wachsmuth K, et al. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol, 1992, 30(8): 2118-2121.
- [7] Singh DV, Isac SR, Colwell RR. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 4321-4324.
- [8] Rivera IN, Chun J, Huq A, et al. Genotypes associated with virulence in environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(6): 2421-2429.
- [9] Prabhu DI, Pandian RS, Vasan PT. Pathogenicity, antibiotic susceptibility and genetic similarity of environmental and clinical isolates of *Vibrio cholerae*. Indian J Exp Biol, 2007, 45(9): 817-823.
- [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. Chin J Exp Clin Infect Dis: Electronic edition, 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. 中华试验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(4): 366-371.
- [11] Yu L, Zhou Y, Wang R, et al. Multiple antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* serogroup O139 in China from 1993 to 2009. PLoS One, 2012, 7(6): e38633.
- [12] Yang XR, Xu YF, Feng ZH, et al. Analysis on toxin gene and pulsed-field gel electrophoresis of cholera of Sichuan province in 2006. J Prev Med Inf, 2007, 23(6): 691-694. (in Chinese) 杨小蓉, 徐耀方, 冯泽惠, 等. 2006年四川省部分地区霍乱弧菌毒力基因监测和脉冲场凝胶电泳分型分析. 预防医学情报杂志, 2007, 23(6): 691-694.
- [13] Hu SX, Deng ZH, Gao LD, et al. Research of epidemiological factors and control measures for *Vibrio cholerae* O139 in Hunan province. Pract Prev Med, 2010, 17(4): 651-653. (in Chinese) 胡世雄, 邓志红, 高立冬, 等. 湖南省O139霍乱流行因素及预防控制措施研究报告. 实用预防医学, 2010, 17(4): 651-653.
- [14] Tu LH, Chen HY, Chen M. Study on 14 strains of *Vibrio cholerae* O139 isolated in Chongming by PFGE and ribotyping. Dis Surveil, 2011, 26(2): 159-160. (in Chinese) 屠丽红, 陈洪友, 陈敏. 利用脉冲场凝胶电泳及核糖体分型技术对14株上海崇明地区O139群霍乱弧菌分型分析. 疾病监测, 2011, 26(2): 159-160.

(收稿日期: 2013-04-22)  
(本文编辑: 万玉立)