

· 现场调查 ·

烟台地区非 O1/O139 群霍乱弧菌致病性分析

刘文娟¹ 田云龙¹ 李燕¹ 宋燕¹ 张艺¹ 张馨予¹ 王文君²¹烟台市疾病预防控制中心微检科,烟台 264003;²烟台市海洋环境监测预报中心海洋减灾科,烟台 264000

通信作者:王文君,Email:wangwenjun1982@126.com

【摘要】目的 了解烟台地区非 O1/O139 群霍乱弧菌致病性现状。**方法** 分别于 2020 年 7 月和 11 月、2021 年的 1 月和 4 月对烟台市某两条河入海口采集样本 32 份,获得 22 株非 O1/O139 群霍乱弧菌分离菌株,采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对分离菌株进行分子分型,采用聚合酶链式反应(PCR)方法对该 22 株分离菌株的毒力基因 *ctxA*、*ctxB*、*ace*、*cep*、*zot*、*rtxA*、*hlyA*、*toxR*、*tcpA* 和 *cri* 进行检测分析。**结果** 22 株非 O1/O139 群霍乱弧菌菌株间的条带相似度为 23.0%~100.0%,分为 17 个 PFGE 型,呈高度的多态性带型分布。22 株非 O1/O139 群霍乱弧菌分离株主要携带 3 种毒力基因(*rtxA*、*tcpA* 和 *zot*),其中携带 *rtxA* 和 *tcpA* 最多,均为 17 株,其次是 *zot*,共 14 株。14 株菌株同时携带 *rtxA*、*tcpA* 和 *zot*,5 株不携带上述毒力基因。**结论** 烟台地区入海口流行的非 O1/O139 群霍乱弧菌污染情况多样化,主要携带具有黏附、毒素以及损伤小肠表皮细胞等方面的致病基因。

【关键词】 霍乱;非 O1/O139 群霍乱弧菌;毒力基因;分子溯源;致病性;多态性

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划(2018WS041)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20221012-00219

Pathogenicity of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* in YantaiLiu Wenjuan¹, Tian Yunlong¹, Li Yan¹, Song Yan¹, Zhang Yi¹, Zhang Xinyu¹, Wang Wenjun²¹Department of Microexamination, Yantai Center for Disease Control and Prevention, Yantai 264003, China; ²Marine Disaster Reduction Division, Yantai Marine Environment Monitoring and Prediction Center, Yantai 264000, China

Corresponding author: Wang Wenjun, Email: wangwenjun1982@126.com

【Abstract】Objective To understand the pathogenic characteristics of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* in Yantai. **Methods** A total of 32 samples were collected from the estuary of 2 rivers in Yantai in July and November 2020, and in January and April 2021. Among these samples, 22 strains of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* were isolated and molecular typed by pulse field gel electrophoresis (PFGE). Their virulence genes including *ctxA*, *ctxB*, *ace*, *cep*, *zot*, *rtxA*, *hlyA*, *toxR*, *tcpA* and *cri* were detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results** The results showed that 22 strains of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* were divided into 17 PFGE types with highly polymorphic distribution, and the similarities were between 23.0% and 100.0%. These isolates mainly carried 3 virulence genes (*rtxA*, *tcpA* and *zot*) with the highest positive rates of *rtxA* and *tcpA* (17 strains, respectively), followed by *zot* (14 strains). A total of 14 strains carried multiple genes of *rtxA*, *tcpA* and *zot*, while 5 strains did not carry these virulence genes. **Conclusions** The distribution of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* in the estuary in Yantai is diverse. The pathogenic genes have the effect of adhesion, toxins, as well as the injury of small intestine epidermis cells.

【Key words】 Cholera; Non-O1/O139 *Vibrio cholerae*; Virulence gene; Molecular traceability; Pathogenicity; Polymorphism

Fund program: Shandong Province Medical Health Science and Technology Development Plan(2018WS041)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20221012-00219

非 O1/O139 群霍乱弧菌是指除 O1 群和 O139 群以外的霍乱弧菌,其广泛存在于外环境中,在污水、海水和河水等水体以及海产品、动物和人群中均能检出^[1],是引发夏、秋季腹泻和食物中毒的主要病原菌^[2],临床表现为胃肠炎或是腹泻。近年来国内外关于非 O1/O139 群霍乱弧菌致病的报道逐渐增多,部分地区非 O1/O139 群霍乱弧菌的发病率已远高于 O1 群和 O139 群^[3-4],但是对其致病性及其分子特征了解甚少。本研究对烟台市疾病预防控制中心分离得到的 22 株非 O1/O139 群霍乱弧菌致病性特征进行分析,旨在充分了解其致病性现状,为制定有效防控措施提供科学依据。

材料与方法

一、菌株来源

选择烟台市某 2 条河的入海口,每条河设立 2 个采样点,间隔 50 m 离岸边 1 m,水深处 30 cm 处,于 2020 年 7 月和 11 月、2021 年的 1 月和 4 月分别进行河水样本采集,每个采样点每次采集 2 份样本,每份 500 mL,共采集样本 32 份,获得非 O1/O139 群霍乱菌株 22 株。

二、主要试剂及设备

主要试剂包括硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS)(北京陆桥技术股份有限公司)、弧菌显色培养基(法国科玛嘉公司)、霍乱弧菌诊断血清(宁波天润生物药业有限公司)、肠杆菌和其他非苛养革兰阴性杆菌鉴定试剂盒(比色法,API20E)[梅里埃诊断产品(上海)有限公司]、革兰阴性细菌 DNA 提取试剂(北京卓诚惠生生物科技有限公司)、毒力基因引物(北京华大基因)、SeaKem Golge Agarose(Cambrex BioScience Rockland)、Xba I 和 Not I 限制性内切酶(宝日医生物技术有限公司)、蛋白酶 K(法国 MERCK 公司)、2×Taq PCR Master Mix(北京华大基因)、校准标志(Alignment Marker)和大小标志(Size Marker)(北京卓诚惠生生物科技有限公司)。

主要仪器包括浊度仪(美国 BioMerieux 公司)、荧光定量仪(美国 thermo Qubit4.0)、全自动毛细管凝胶电泳(德国凯杰 QIAxcel Advanced)、脉冲场凝胶

电泳仪(美国伯乐 Bio-Rad CHEF-DR III)、凝胶成像系统(美国伯乐 Bio-Rad DOC XR+)、质谱仪(德国布鲁克 microflex MALDITOF)、BioNumerics Version 6.0 图像分析软件,标准参考菌株 H9812 由山东省疾病预防控制中心提供。

三、研究方法

1. 霍乱弧菌分离培养方法

取 450 mL 的水样本,加 50 mL 10 倍浓缩的碱性蛋白胨水,36 °C 24 h 培养后,划线接种 TCBS 平板、弧菌显色平板,挑取可疑菌落进行质谱仪鉴定,将鉴定结果为霍乱弧菌的分离株采用肠杆菌和其他非苛养革兰阴性杆菌鉴定试剂盒(比色法)(API20E)进行复核,用 O1 群及 O139 群霍乱弧菌诊断血清进行玻片凝集试验。

2. 非 O1/O139 群霍乱弧菌分离菌株的分子分型实验方法

按照 PulseNet 公布的霍乱弧菌脉冲场凝胶电泳(PFGE)标准操作过程进行试验,使用内切酶 Not I 酶切(标准菌株 H9812 使用 Xba I 酶切)进行胶块内染色体 DNA 的酶切,脉冲场电泳仪上电泳(温度 14 °C、起始转换时为 10 s,终止转换时间为 35.03 s)19 h。电泳结束后,GelRed 染色 30 min,脱色 90 min 后,使用 GelDoc XR+ 拍摄图像。用 BioNumerics 软件对电泳图像进行数据分析,得到菌株带型相似性的聚类分析图谱。

3. 非 O1/O139 群霍乱弧菌基因组 DNA 提取方法

采用革兰阴性杆菌 DNA 提取试剂,提取经 36 °C 24 h 培养后 22 株分离株核酸,100 °C 水浴 10 min 后离心,取上清,得到基因组 DNA 浓度 80~160 ng/μL,最终获得体积是 60 μL 的核酸提取液。

4. 非 O1/O139 群霍乱弧菌毒力基因检测方法

毒力相关基因 *ctxA*、*ctxB*、*ace*、*cep*、*zot*、*rtxA*、*hlyA*、*toxR*、*tcpA* 和 *cri* 的引物序列根据 GenBank 公布的序列利用 Premier 5.0 软件设计^[5],由华大基因合成,见表 1。按照片段大小分两组进行 5 重扩增反应,其中 *zot*、*tcpA*、*rtxA*、*ctxB*、*ctxA* 为一组,*ace*、*cep*、*hlyA*、*toxR*、*cri* 为另一组。PCR 反应总体积 50 μL,每个体系 2×Taq 聚合酶链式反应混合物(PCR

Master Mix)25 μL;引物(10 μmol/L)每组 2 μL;水焦碳酸二乙酯(DEPC)10 μL;模板 5 μL。反应程序:94 ℃、10 min;94 ℃、30 s;55 ℃、30 s;72 ℃、1 min;35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在全自动毛细管电泳仪进行电泳分析,校准标志 15 bp/3 kb,大小标志 100 bp~2.5 kp。

结 果

一、霍乱弧菌分离结果

采集的 32 份样本共获得霍乱菌株 22 株,质谱仪与 API20E 的鉴定结果符合率 100.0%,与 O1 群及 O139 群霍乱弧菌诊断血清做玻片凝集试验,均未出现肉眼可见的明显凝集,且生理盐水均不凝集。

二、非 O1/O139 群霍乱弧菌分离菌株的分子分型情况

22 株非 O1 /O139 群霍乱弧菌菌株间的条带相似度为 23.0%~100.0%,共分为 17 个 PFGE 型,呈现高度的多态性带型分布特点,具体结果见图 1。带型分布与菌株的分离时间、采样点等无关联,同一样本分离出的菌株呈现不同的带型。

三、非 O1/O139 群霍乱弧菌分离菌株的毒力基因携带情况

22 株非 O1 /O139 群霍乱弧菌分离菌株中,主

表 1 毒力基因 PCR 扩增引物序列

引物名称	引物序列(5~3')	扩增片段大小(bp)
<i>ctxA</i> -f	ATGGTAAAGATAATATTTGTGTTTT	777
<i>ctxA</i> -r	TCATAATTCATCCTTAATTCTATTA	
<i>ctxB</i> -f	ATGATTAATAIAAAATTTGGTGTIT	375
<i>ctxB</i> -r	TTAATTTGCCATACTAATTGCCGCA	
<i>cep</i> -f	ATGTTTAGCTCACTGAAAAAC	249
<i>cep</i> -r	CTATTTAGCCTTACGAATT	
<i>ace</i> -f	ATGCTIATGATGGACACCCCTTATG	294
<i>ace</i> -r	TCATAGGTTTAAACGCTCGC	
<i>zot</i> -f	ATGAGTATCTTTATTCATCAC	1 200
<i>zot</i> -r	TCAAAATATACTATTTTACTCCT	
<i>tcpA</i> -f	GAACACGATAAGAAAACCG	461
<i>tcpA</i> -r	ACAGCAGCGAAAGCACCT	
<i>cri</i> -f	TTGTTGGATGTCGGCTTAG	955
<i>cri</i> -r	GGTTATGGATTGGGTCTTC	
<i>rtxA</i> -f	CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG	417
<i>rtxA</i> -r	GTTGATTGTTGATATCCGCTACG	
<i>toxR</i> -f	GAGCCTTCTGCACTATTGTCA	1 347
<i>toxR</i> -r	ATTACCTTGATGTGCAAGTGAG	
<i>hlyA</i> -f	GAGCCGGCATTCTGTAAT	481
<i>hlyA</i> -r	CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA	

要携带 3 种毒力基因(*rtxA*、*tcpA* 和 *zot*),其中携带 *rtxA* 和 *tcpA* 的菌株最多,共 17 株,其次为携带 *zot* 的菌株,共 14 株。14 株菌株同时携带 *rtxA*、*tcpA* 和 *zot*,5 株不携带上述毒力基因。17 株含毒力基因的

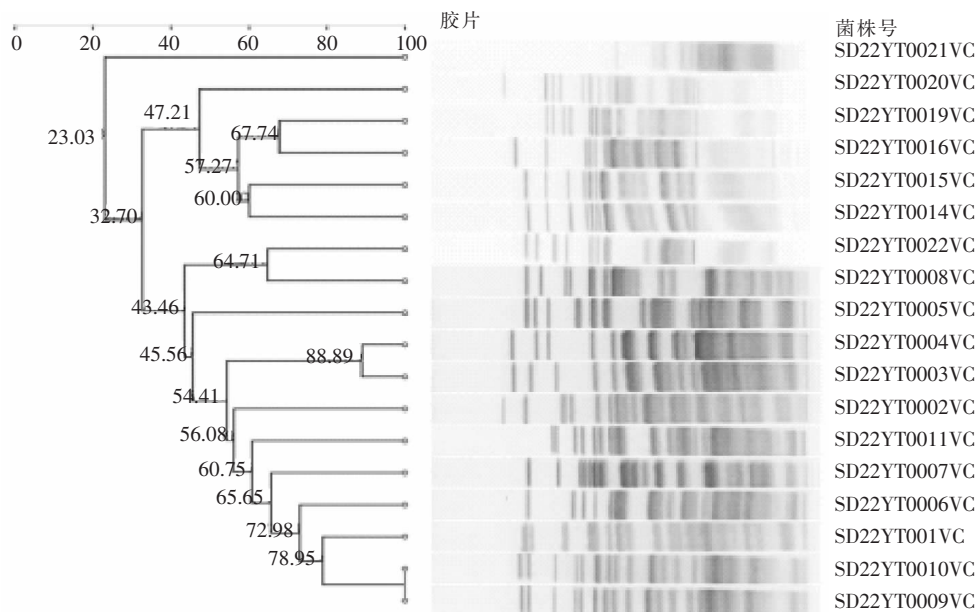


图 1 非 O1 /O139 群霍乱弧菌脉冲场凝胶电泳图谱

分离菌株的毒力基因电泳图谱见图 2,共有 17 条泳道扩增的片段显示含有 *rtxA* (417 bp)、*tcpA* (461 bp)和 *zot*(1 200 bp),其他泳道未见毒力基因扩增片段。

讨 论

近几年,陆续有非 O1/O139 群霍乱弧菌引发的胃肠炎病例发生,烟台作为海滨旅游城市,食品安全尤为重要,提高对食源性疾病事件病原检出率,充分了解潜在的致病因素,可为制定食源性疾病防控措施提供科学依据。

一、非 O1/O139 群霍乱分离菌株的分子分型多样化

22 株非 O1/O139 群霍乱分离菌株的分子分型得到 17 种带型,存在同一份样本的分离株呈现不同图谱、不同采样点以及不同采样时间的分离株图谱不一致的情况,说明分离株的污染情况多样化,与廖凤等^[6]对云南省非 O1/ O139 群霍乱弧菌分子分型结论一致,进一步证实非 O1/O139 群霍乱弧菌是一类高度多态性的菌株^[7],溯源情况复杂,因此在对

弧菌引发的食源性疾病暴发事件进行溯源分析时,存在同期病例不同源,与采集样本分离菌株不同源的情况^[6]。从本研究结果来看,同一样本有不同带型的非 O1/O139 群霍乱同时存在,因此在进行弧菌溯源分析时,应充分考虑多种带型弧菌同时污染造成感染的情况。

二、非 O1/O139 群霍乱分离菌株的毒力基因携带有地域特征

烟台地区入海口分布流行的非 O1/O139 群霍乱弧菌分离菌株主要携带毒力基因 *rtxA* (17 株)、*tcpA* (17 株)和 *zot*(14 株)。云南省 87.1%的菌株 *hly* 基因为阳性,且部分菌株携带 *tcpA* 毒力基因^[6],北京港口水产品中 *ctx*、*toxR*、*hlyA* 均为阴性^[8],河南省淡水养殖环节和来源于患者的菌株均具有黏附、趋化运动、抗吞噬、毒素及酶类等功能的 8 类毒力相关因子基因,缺失辅助定植、毒素共调、分泌等功能的毒力相关因子基因和霍乱肠毒素等 4 个毒素基因^[9],表明非 O1/O139 群霍乱菌株的毒力基因携带情况有明显的地域特征。

通常 O1 群和 O139 群霍乱弧菌致病菌株携带

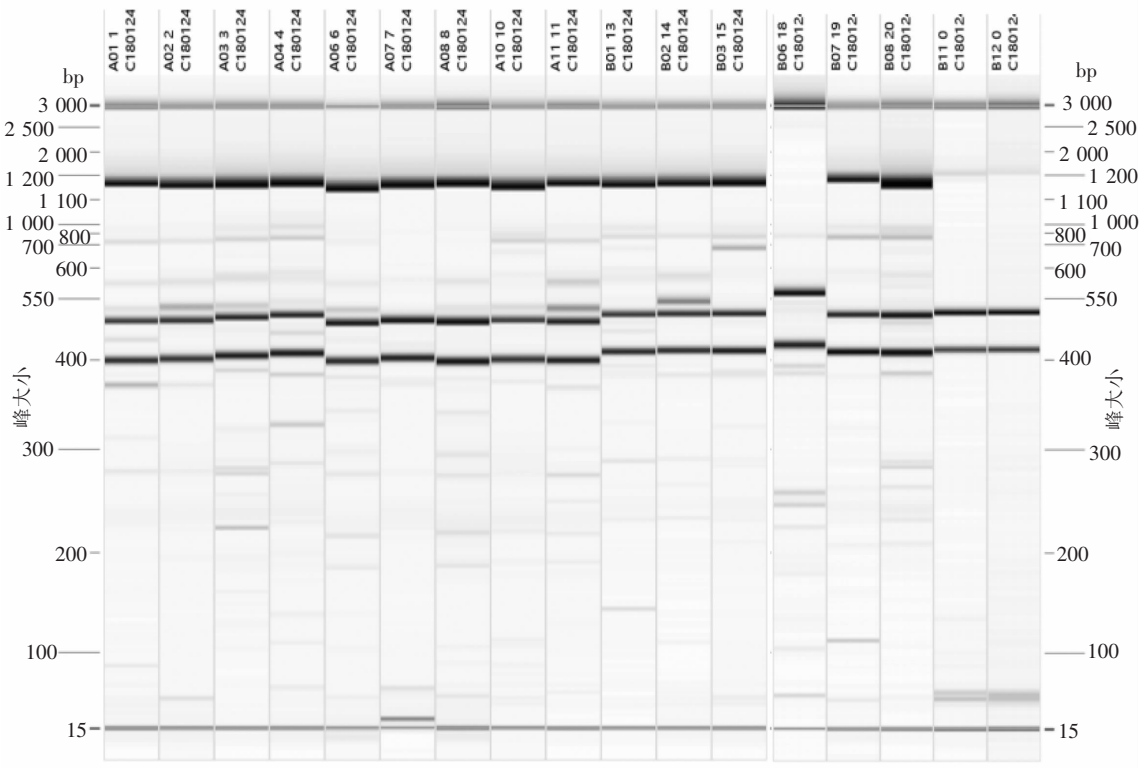


图 2 17 株含毒力基因的非 O1/O139 群霍乱弧菌分离株的毒力基因电泳图谱

ctxAB、*toxR*、*tcpA* 以及致病性毒力岛等毒力基因,其中以 *ctxAB* 霍乱毒素为主要致病因素^[10],*ctx* 毒力单元能产生霍乱毒素并引起霍乱样腹泻,是引起霍乱的主要致病因子,具有很强的免疫原性和佐剂活性^[11]。*zot* 毒力基因是检测霍乱弧菌毒力强弱的另一个指标,其编码的毒素会增加肠黏膜通透性以及细胞间结构的耦合,熊长辉等^[12]研究表明 *zot* 能引起人小肠上皮细胞的早期凋亡。*tcpA* 基因可合成霍乱毒素共调菌毛,是一个重要的定居因子^[13]。*rtxA* 基因编码霍乱弧菌细胞毒素,位于染色体 *CTX* 遗传单元 *RS* 基因下游,因一些临床菌株如副溶血弧菌、大肠埃希氏菌、气单胞菌及邻单胞菌的 *rtxA* 携带为阴性,因此白雪松等^[14]把 *rtxA* 作为检测霍乱弧菌的靶基因,灵敏度良好。

综上所述,烟台地区入海口分布流行的非 O1/O139 群霍乱弧菌分离菌株的致病因素主要是因为携带作用 *tcpA*、*rtxA* 和 *zot*,通过黏附、毒素以及损伤小肠表皮细胞等功能,造成机体腹泻等一系列胃肠炎症状,其致病力不容小觑,建议在处置食源性疾病事件时将非 O1/O139 群霍乱弧菌作为病原因素予以考虑并进行检测,在今后的工作中要加强对其致病力的监测,随时监控其致病情况的变化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘文娟:提出研究思路,实验,数据分析,撰写论文;田云龙:负责进行实验,数据整理;李燕、宋燕、张艺、张馨予:负责实验、样本采集;王文君:设计研究方案,数据分析,论文校对

参 考 文 献

- [1] 肖媛. 广东省 1985-2013 年非 O1/O139 群霍乱弧菌分子特征的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.
- [2] 李志芳, 李华, 刘树欣, 等. 肝硬化腹水中检出非 O1/非 O139 群霍乱弧菌的调查[J]. 疾病预防控制通报, 2020, 35(1): 38-40. DOI: 10.13215/j.cnki.jbyfkztb.1909013.
- [3] Dutta D, Chowdhury G, Pazhani GP, et al. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(3): 464-467. DOI: 10.3201/eid1903.121156.
- [4] 李凤娟, 阚飙, 王多春. 非 O1/O139 群霍乱弧菌: 流行、致病因子和耐药[J]. 疾病监测, 2014, 29(3): 239-242. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2014.03.019.
- [5] 张经宇, 杨梦, 刘晓青, 等. 血液中分离一株 O139 群霍乱弧菌分子生物学检测及药物敏感性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(1): 67-72. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8689.2017.01.012.
- [6] 廖凤, 古文鹏, 徐闻, 等. 云南省非 O1/O139 群霍乱弧菌分子特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(1): 53-56, 66. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.01.010.
- [7] Luo Y, Ye J, Jin D, et al. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China [J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 52. DOI: 10.1186/1471-2180-13-52.
- [8] 付溥博, 张琳, 曾静, 等. 北京港口水产品中非 O1/O139 群霍乱弧菌 MLST 分型研究[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(4): 9-13.
- [9] 炊慧霞, 陈磊, 吴玲玲, 等. 河南省某一淡水养殖环节中非 O1/O139 群霍乱弧菌毒力基因及分子分型分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2021, 37(12): 1091-1095. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2021.00.154.
- [10] Kondo S, Ajawatanawong P. Distribution and sequence analysis of virulence associated genes in *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1/non-O139 isolates from Thailand[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2009, 40(5): 1015-1024.
- [11] Stevceva L, Ferrari MG. Mucosal adjuvants[J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(6): 801-811. DOI: 10.2174/1381612053381846.
- [12] 熊长辉, 杨梦, 刘晓青, 等. 霍乱弧菌毒力基因 *zot* 的克隆表达及生物活性[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(11): 996-1001. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.11.009.
- [13] 王颖芳, 谢婧, 段广才, 等. 霍乱弧菌毒素协同调节菌毛基因 *tcpA* 的克隆及序列分析[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004, 13(2): 97-101.
- [14] 白雪松, 张晓君, 阎斌伦, 等. 基于 *toxR* 和 *rtxA* 基因水生动物 2 种病原弧菌的同步检测方法的建立[J]. 海洋湖沼通报, 2013, 138(3): 95-100. DOI: 10.13984/j.cnki.cn37-1141.2013.03.007.

(收稿日期: 2022-10-12)