· 专题报道之一 ·

广东省 2011—2013 年腹泻病例非 O1/O139 群霍乱弧菌耐药性及分子特征*

肖媛[1], 李柏生[2], 效拟[1], 刘谢[1], 谭海玲[2], 何冬梅[2], 柯碧霞[2], 柯昌文[2], 俞守义[1]

摘　要: 目的　分析 2011—2013 年广东省腹泻病例非 O1/O139 群霍乱弧菌的耐药性及分子特征, 为霍乱防控提供依据。**方法**　选取 2011—2013 年广东省腹泻病例非 O1/O139 群霍乱弧菌分离株 20 株, 以及同时期海水产品分离株 4 株, 采用抗菌药物敏感试验、毒力基因 PCR 检测和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型方法, 分析其耐药性及分子特征。**结果**　抗菌药物敏感性试验结果显示, 分离株对复方新诺明、萘啶酸和四环素的耐药率分别为 70.8%(17/24), 37.5%(9/24)和 20.8%(5/24); 对头孢曲松和阿米卡星则完全敏感。毒力基因 PCR 检测结果显示, 所有的菌株均携带 hlyA 和 toxR 基因, 而所有菌株均未检出 ctxA、tcpA、ace、zot、st 等 5 种毒力基因。菌株经 Not Ⅰ 酶切后的 PFGE 型别表现出明显的多样性, 病例菌株与海水产品分离株的带型差别较大。**结论**　广东省非 O1/O139 群霍乱弧菌毒力基因和遗传特征复杂多样, 菌株对多种抗菌药物高度耐药, 耐药率较高, 需加强腹泻病例中非 O1/O139 群霍乱弧菌的菌株型别变异及耐药监测。

关键词: 非 O1/O139 群霍乱弧菌; 毒力基因; 聚合酶链反应; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R 378.3　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)01-0032-04　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-01-10

Drug resistance and molecular characteristics of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* isolated from diarrhea cases in Guangdong province between 2011 and 2013

XIAO Yuan*, LI Bai-sheng, XIAO Ni, et al(*Department of Epidemiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province* 510515, China)

Abstract: Objective　To analyze phenotypic and molecular characteristics of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) strains isolated from diarrhea cases in Guangdong province between 2011 and 2013. **Methods**　Totally 24 non O1/O139 *V. cholerae* strains were isolated(20 from diarrhea cases, 4 from seafood) in Guangdong province between 2011 and 2013. The antimicrobial susceptibility of the strains was assessed with K-B test; virulence genes were determined by PCR; and molecular typing was carried out by pulsed field gel electrophoresis(PFGE). **Results**　Antimicrobial susceptibility test showed that of the 24 strains, 17 were resistant to trimethoprim sulphamethoxazole, 9 to nalidixic acid, and 5 to tetracycline, with the resistant rate of 70.8%, 37.5%, and 20.8%, respectively, while all the strains were sensitive to ceftriaxone and amikacin. PCR detection of virulence gene showed that all the strains were positive for hlyA and toxR gene, but negative for ctxA, tcpA, ace, zot, and st genes. PFGE molecular typing of the strains digested by Not Ⅰ demonstrated significant diversity among the strains, especially between the strains isolated from cases and seafood. **Conclusion**　The virulence genes and genetic characteristics of non-O1/O139 *V. cholerae* strains isolated from diarrhea cases in Guangdong province was complex and were highly resistant to many antimicrobial agents, suggesting the importance to strengthen the monitoring of the genetic variation and drug resistance of the isolated strains in Guangdong province.

Key words: non-O1/O139 *V. cholerae*; virulence gene; PCR; PFGE

非 O1/O139 群霍乱弧菌是指除 O1 群和 O139 群霍乱弧菌以外的其他霍乱弧菌的总称[1]。以往研究认为非 O1/O139 群霍乱弧菌不致病或者仅引起散在的轻度腹泻。近年来, 有报道发现有些非 O1/O139 群霍乱弧菌可产生霍乱肠毒素, 从而引起人类腹泻并时有暴发流行, 因此受到细菌学家和流行病学家的广泛关注[2]。O1 和 O139 群霍乱弧菌致病通常与 CTXΦ 基因元件、VPI 毒力岛、毒力基因表达调控基因、细菌外膜蛋白粘附因子以及其他潜在的毒力基因相关, 以往研究发现非 O1/O139 群霍乱弧菌也可检出上述毒力基因, 但检出率报道不一[3]。本研究收集广东省 2011—2013 年腹泻病例来源的 20 株非 O1/O139 群霍乱弧菌, 以及同时期分离的 4 株海水产品来源菌株, 分析其抗菌药物敏感性、毒力基因携带情况, 并应用脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)方法分析其

* **基金项目**: 国家科技重大专项(2012ZX10004-213)
作者单位: 1. 南方医科大学公共卫生与热带医学院流行病学教研室, 广东 广州 510515; 2. 广东省疾病预防控制中心微生物检验所
作者简介: 肖媛(1990-), 女, 江西抚州人, 硕士在读, 研究方向: 分子流行病学。
通讯作者: 俞守义, E-mail: qingchen@fimmu.com; 柯昌文, E-mail: kecw2011@sina.com
数字出版日期: 2014-12-4 11:26
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20141204.1126.006.html

分子遗传特征,为广东省霍乱预防控制提供依据。

1　材料与方法

1.1　材料　选取 2011—2013 年广东省腹泻监测分离的病例来源菌株 20 株以及同期海水产品来源菌株 4 株,共 24 株非 O1/O139 群霍乱弧菌。阳性对照菌株采用 O1 群霍乱弧菌标准株 N16961(中国疾病预防控制中心传染病所赠送)。

1.2　主要试剂与仪器　药敏纸片(英国 Oxiod 公司);MH 琼脂平板培养基;Taq Premix、DL2000 Marker、限制性内切酶 XbaI 、Not I、琼脂糖((大连宝生物公司);Seakem Gold 低熔点琼脂糖(美国 Cambrex Bio Science Rockland 公司)。主要仪器包括 Biometra TGradient PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司);电泳仪(日本 Cosmo 公司);Gel Doc EQ 自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad CHEF Mapper),引物序列由上海生物工程有限公司合成。

1.3　方法

1.3.1　药物敏感试验　采用 WHO 推荐的改良 K-B 纸片法。抗菌药物包括氨苄西林(AMP,10 μg)、四环素(TCY,30 μg)、复方新诺明(SXT,1125,23 μg)、氯霉素(CHL,30 μg),美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐,抑菌圈判定标准参照文献[4];多西环素(DOX,30 μg)、诺氟沙星(NOR,10 μg)、环丙沙星(CIP,5 μg)、阿米卡星(AMK,30 μg),药敏实验操作和抑菌圈判定标准参照文献[5];头孢噻肟(CTX,30 μg)、头孢曲松(CRO,30 μg)、萘啶酸(NAL,30 μg),本实验室内部监测药物。抑菌圈判定标准参考文献[4]。质控菌株采用大肠埃希菌 ATCC25922(购自美国美国菌种保藏中心 ATCC)。

1.3.2　基因组 DNA 提取　用煮沸法提取菌株核酸,挑取纯培养的菌落至 200 μL 无菌水中混匀,煮沸 15 min 后立即转移至冰上 5 min,10 000 r/min 离心 10 min 后取上清,-20 ℃保存。

1.3.3　毒力基因的多重 PCR 测定(表 1)　用多重 PCR 扩增霍乱弧菌 CTXΦ 基因元件(ctxA、zot、ace),VPI 毒力岛(tcpA、tcpI),毒力基因表达调控基因(toxR),细菌外膜蛋白粘附因子(ompU)以及其他潜在的毒力基因(hlyA、st、mshA、TTSS、chxA)等 12 种毒力基因[6-8]。各毒力基因引物序列见表 1。PCR 反应体系为 25 μL,内含 12.5 μL Taq Premix (2×),上、下游引物各 1 μL,模板 DNA 1 μL。设立空白对照(试剂)和阳性对照(N16961)。扩增产物用 0.5×Tris-borate-EDTA 配制的 1% 的琼脂糖凝胶中电泳,以 DL 2000 Marker 为参照,电泳后的胶块于自动凝胶成像系统中观察记录结果。

表 1　12 种毒力基因引物序列、产物长度及扩增条件

引物名称	引物序列(5′—3′)	产物长度(bp)	扩增条件
ctxA-F	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	542	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
ctxA-R	CGATGATCTTGGAGCATTCCCAC		
tcpA-F	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG	620	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
tcpA-R	TTACCAAATGCAACGCCGAATG		
OmpU-F	ACGCTGACGGAATCAACCAAAG	869	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
OmpU-R	GCGGAAGTTTGGCTTGAAGTAG		
ace-F	TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC	289	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
ace-R	CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG		
hlyA-F	GGCAAACAGCGAAACAAATACC	738	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
hlyA-R	CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA		
tcpI-F	TAGCCTTAGTTCTCAGCAGGCA	862	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
tcpI-R	GGCAATAGTGTCGAGCTCGTTA		
toxR-F	CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC	779	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
toxR-R	AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG		
St-F	GAGAAACCTATTCATTGC	216	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
St-R	GCAAGCTGGATTGCAAC		
zot-F	TCGCTTAACGATGGCGCGTTTT	947	94 ℃,2 min;94 ℃,1 min,50 ℃,1 min,72 ℃,1 min,25 个循环,72 ℃,3 min
zot-R	AACCCCGTTTCACTTCTACCCA		
mshA-F	CGCACAATGAGGTTCGCCAAG	512	94 ℃,5 min;94 ℃,45 s,55 ℃,45 s,72 ℃,45 s,30 个循环,72 ℃,5 min
mshA-R	CCGAAAATTGACCGCCATTATC		
TTSS(vcsV2)-F	ATGCAGATCTTTTGGCTCACTTGATGGG	742	94 ℃,5 min;94 ℃,45 s,55 ℃,45 s,72 ℃,45 s,30 个循环,72 ℃,5 min
TTSS(vcsV2)-R	ATGCGTCGACGCCACATCATTGCTTGCT		
chxA-F	TGTGTGATGATGCTTCTGG	2 000	94 ℃,5 min;94 ℃,30s,52 ℃,30 s,72 ℃,1 min,30 个循环,72 ℃,7 min
chxA-R	TTATTTCAGTTCATCTTTTCGC		

1.3.4　PFGE 分子分型　24 株测试菌的分型参照国际致病菌分子分型实验室监测网络 PulseNet International 制订的“霍乱弧菌脉冲场凝胶电泳 PFGE 标准操作方案”[9] 进行。DNA 分子量标准为沙门菌 H9812。霍乱弧菌选用限制性内切酶 Not I 酶切,200 μL 体系,酶切 4 h,37 ℃。Marker 沙门菌 H9812 选择 Xba I 酶切,其余参数与霍乱弧菌菌株相同。电泳条件为:电泳程序首先为 6.0 V/cm,2 ~ 10 s,120 °夹角,13 h;其次为 6.0 V/cm,20 s ~ 25 s,120 °夹角,6 h。完成 PFGE 图谱,并利用 BioNumerics 软件(Applied Maths BVBA)分析图谱,得到菌株带型相似性的聚类分析树图。

2　结　果

2.1　抗菌药物敏感性情况(表 2)　对 24 株非 O1/O139 群霍乱弧菌进行了 11 种抗菌药物敏感性试验,结果显示,复方新诺明的耐药率最高,萘啶酸和四环素为中等耐药,多西环素、氨苄西林、氯霉素和头孢噻肟有低度耐药,头孢曲松和阿米卡星则完全敏感,一部分菌株对氯霉素和四环素中度敏感。

表 2　非 O1/O139 群霍乱弧菌抗菌药物敏感性试验

抗生素	耐药		中敏		敏感	
	株	%	株	%	株	%
复方新诺明	17	70.8	0	0.0	7	29.2
萘啶酸	9	37.5	2	8.3	13	54.2
环丙沙星	0	0.0	1	4.2	23	95.8
诺氟沙星	0	0.0	1	4.2	23	95.8
四环素	5	20.8	5	20.8	14	58.4
多西环素	2	8.3	1	4.2	21	87.5
氯霉素	1	4.2	7	29.0	16	65.0
头孢噻肟	1	4.2	0	0.0	23	95.8
头孢曲松	0	0.0	0	0.0	24	100.0
氨苄西林	2	8.3	0	0.0	22	91.7
阿米卡星	0	0.0	0	0.0	24	100.0

2.2　耐多药率情况　20 株分离自病例的菌株中,耐多药 13 株,耐多药率为 65%;其中 1 株对复方新诺明和萘啶酸双重耐药,1 株对复方新诺明和四环素双重耐药,3 株对复方新诺明、萘啶酸和氯霉素三重耐药,2 株对复方新诺明、四环素和氯霉素三重耐药,2 株对复方新诺明、萘啶酸和四环素三重耐药,1 株对复方新诺明、氯霉素和四环素三重耐药,1 株对萘啶酸、氯霉素和四环素三重耐药,1 株对复方新诺明、四环素、萘啶酸、诺氟沙星和环丙沙星五重耐药,1 株对复方新诺明、四环素、萘啶酸、氯霉素和头孢噻肟五重耐药;4 株海水产品来源的菌株中,耐多药 1 株,耐多药率为 25%,表现为复方新诺明、四环素和氯霉素三重耐药。

2.3　菌株毒力基因特征　对 24 株非 O1/O139 群霍乱弧菌进行 12 种毒力基因检测,所有的菌株均携带 *hlyA* 和 *toxR* 基因,与此同时,均未检出 *ctxA*、*tcpA*、*ace*、*zot*、*st* 5 种毒力基因。4 株海水产品来源菌株有 2 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $ompU^+$ $tcpI^+$ $mshA^+$ $TTSS^+$ $chxA^+$ 基因型,1 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $ompU^+$ $tcpI^+$ 基因型,1 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $mshA^+$ 基因型;20 株病例来源有 5 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $mshA^+$ 基因型,4 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $ompU^+$ 基因型,3 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $mshA^+$ $TTSS^+$ 基因型,3 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ 基因型,1 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $ompU^+$ $mshA^+$ $TTSS^+$ $chxA^+$ 基因型,1 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $mshA^+$ $TTSS^+$ $chxA^+$ 基因型,2 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $ompU^+$ $mshA^+$ $TTSS^+$ 基因型;1 株为 $hlyA^+$ $toxR^+$ $ompU^+$ $tcpI^+$ 基因型。

2.4　PFGE 分型　(图 1)对 24 株非 O1/O139 群霍乱弧菌进行 PFGE 分型(Not I 酶切),共分为 24 个型别,PFGE 带型相似度为 75% ~97.6%,病例来源菌株与同期海水产品来源菌株经 Not I 酶切后的带型各不相同,无明显的聚类;不同年份以及不同地区来源的菌株也不形成明显的聚类。

3　讨　论

本研究中 24 株菌均未检出 *ctxA*、*tcpA*、*ace*、*zot*、*st* 5 种毒力基因,表明这 24 株菌不具有引起霍乱的典型毒力基础,暂不具备引起烈性传播的可能性,但在今后的日常监测工作中仍应重视霍乱毒素基因的检测,从病例及监测样品中分离到非 O1/O139 群霍乱菌株仅仅是第一步,如何快速检测到产毒株,并及时进行防范,对霍乱疫情的控制具有重要意义。

根据已有的研究和报道,非 O1/O139 群霍乱弧菌主要分离自环境,并不引起或仅少数引起散发的腹泻[6,10]。近年,从腹泻病例分离得到非 O1/O139 群霍乱弧菌日益增多。目前报道的引起腹泻的非 O1/O139 群霍乱弧菌中,有些菌株致病因子与 01 群或者 O139 群霍乱弧菌相似[10],故认为非 O1/O139 群霍乱弧菌可能通过基因水平转移的方式获得 TCP 或 CT 2 种毒力而成为产毒株[11],引起腹泻。但大多数病例来源的非 O1/O139 群霍乱弧菌菌株并不携带 TCP、CT 等致病因子的基因簇,致病机制难以解释。

本研究结果显示,24 株菌株的毒力基因型别多样,在所有菌株中均检测出 *toxR* 和 *hlyA* 基因,这与国内报道基本一致[12];本研究结果显示 4 株(16.67%)霍乱弧菌携带 tcpI 基因,11 株(45.83%)霍乱菌株携带 *ompU* 基因,提示其不仅仅有病理学意义,还有更重要的生理学意义[13]。本研究结果显示 9 株

中国公共卫生 CPH

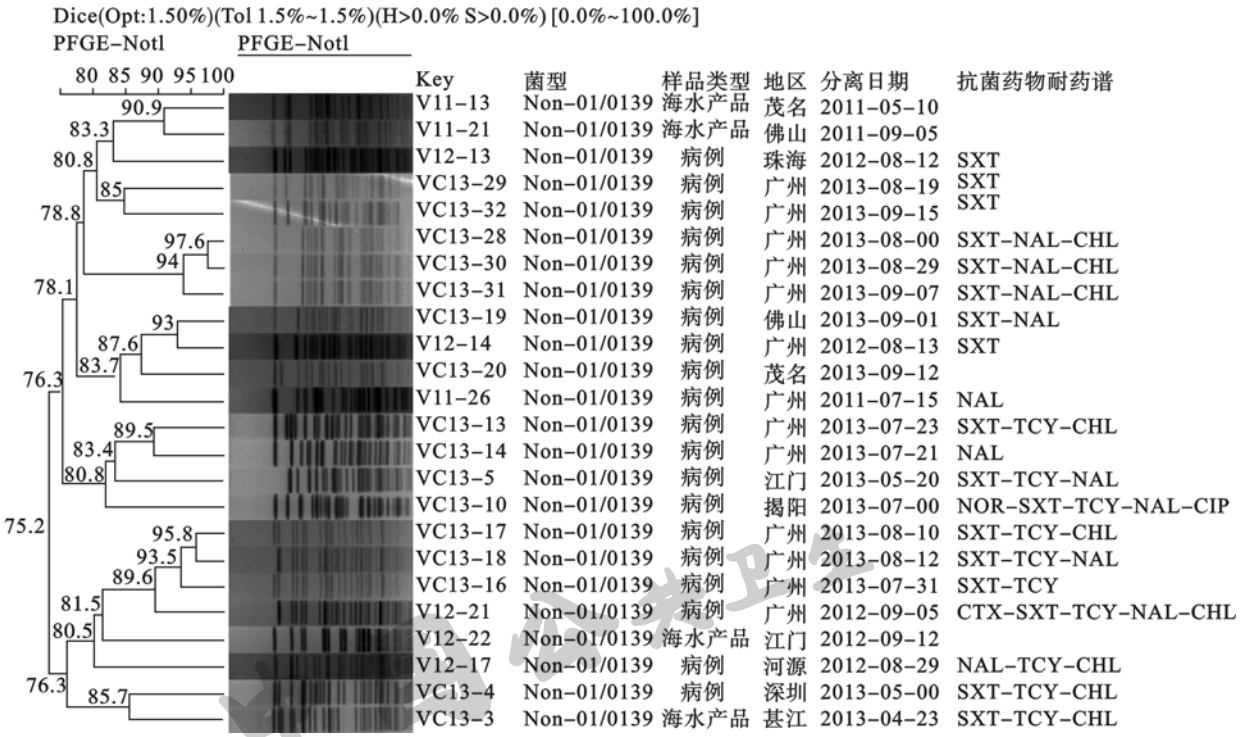

图 1　2011—2013 年非 O1/O139 群霍乱弧菌 PFGE 指纹图谱及抗菌药物耐药谱

(37.5%)霍乱弧菌携带 *TTSS* 基因,与 Chatterjee 等[8]的结果一致,有研究报道在 1 株致腹泻但不产霍乱毒素的非 O1/O139 群菌株,发现Ⅲ型分泌系统(TTSS)在致肠道黏膜病理改变以及致腹泻方面的重要作用[14]。与产毒霍乱弧菌导致的腹泻有不同,该菌导致肠黏膜明显的病理损伤,提示不产毒素的霍乱弧菌菌株可能存在其他的致病机制,有待进一步研究。

本研究 24 株非 O1/O139 群霍乱弧菌对 11 种药物进行药敏试验,发现分离自病例的菌株对四环素、萘啶酸、氯霉素和复方新诺明等多种抗生素有一定耐药;分离自海水产品的菌株对四环素、氯霉素和复方新诺明耐药。整体来看,本研究 24 株菌株对磺胺类,一代喹喏酮类,四环素类等传统抗生素耐药率较高,对临床上目前常用的新一代抗菌药物诺氟沙星、环丙沙星和多西环素等具有较高的敏感率,提示治疗效果较好,但仍应注意合理用药,避免耐药菌株,尤其是多重耐药菌株的产生。

将分离的 24 株菌进行 PFGE 图谱聚类分析,显示菌株间差异较大,24 株菌分带型均不相同,提示病例及海水产品中的非 O1/O139 群霍乱弧菌存在明显的遗传多样性。

参考文献

[1] Shimada T. Expended serotyping scheme for *Vibrio cholerae* [J]. Curr Microbiol, 1994, 281: 175.

[2] 丁健清,田永琴,王书梅,等. 外膜蛋白(OmpW)引物扩增技术在非 O1 群霍乱弧菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(4): 64 - 68.

[3] 徐景野,许国章. 非 O1/非 139 群霍乱弧菌病原学研究进展[J]. 中国卫生检验杂志. 2003, 13(5): 535 - 537.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antinicrobial susceptibility testing: eighteenth informational supplement[S]. MCCLS, 2008.

[5] 卫生部病疾病控制司. 霍乱防治手册[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 1999.

[6] 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 [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 910 - 921.

[7] Awasthi SP, Asakura M, Chowdhury N, et al. Novel cholix toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains, and their pathogenicity [J]. Infect Immun, 2013, 81(2): 531 - 541.

[8] Chatterjee S, Ghosh K, Raychoudhuri A, et al. Incidence, virulence factors, and clonality among clinical strains of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates from hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India[J]. Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1087 - 1095.

[9] Centers for Disease Control and Prevention. Rapid standaidized laboratory protocol for molecular subtyping of *Vibrio cholera* by pulsed field gel electrophoresis(PFGE)[S]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention. 2006.

[10] Sharma C, Thungapathra M, Ghosh A, et a1. Molecular analysis of non-Ol, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India [J]. Clin Microbi, 1998, 36(3): 756 - 763.

[11] 芮勇宇,许锐恒,阚飙,等. 霍乱弧菌主要毒力和管家基因序列分析[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(1): 31 - 33.

[12] 陈琛,王中强,柳楠,等. 疑似霍乱弧菌鉴定及分子分型检测[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(1): 57 - 58.

[13] Karunasagar I, Rivera I, Joseph B, et al. ompU genes in non-toxigenic *Vibrio cholerae* associated with aquaculture [J]. J Appl Microbiol, 2003, 95: 338 - 343.

[14] Shin OS, Tam VC, Suzuki M, et a1. Type Ⅲ secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-01, non-0139 *Vibrio cholerae*[J]. MBio, 2011, 2(3): e00106 - 11.

收稿日期: 2014-08-04　　(吴少慧编辑　周欣琳校对)