

上海市宝山区2株疑似霍乱弧菌的鉴定及分析

沈隽卿¹, 曹钟艺¹, 屠丽红²

(1. 上海市宝山区疾病预防控制中心, 上海 201901; 2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

霍乱是由 O1 群和 O139 群霍乱弧菌引起的急性肠道传染病, 是发病急、传播快、波及面广、危害严重的甲类传染病。解放前, 我国的霍乱主要由 O1 群古典生物型引起, 1961 年我国广东省首次出现 El Tor 生物型霍乱流行^[1], 1993 年, 在新疆局部地区发生 O139 血清霍乱^[2]。上海市宝山区从 1962 年开始流行霍乱, 当年本地人口病例数 59 人, 发病率为 12/10 万; 1978—1981 年为发病高峰期, 1980 年发病率最高为 15/10 万; 1994 年有 1 次大爆发, 病例数达到 109 人, 隔年病例数即下降至 12 人; 1996—2004 年, 处于霍乱低发时期, 偶有散发病例, 共检出 10 例阳性; 2005—2011 年无本地病例检出; 2012 年 5 月检出 1 株 O139 群霍乱弧菌。同我国近 10 年来的霍乱流行特点基本符合, 多为小范围的爆发流行及散发, 多数爆发为卫生条件较差的聚餐活动引起, 同时出现了以稻叶型为高发流行优势菌的发展趋向和低发水平时 O139 霍乱病例所占比例较高的特点^[1]。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2012 年 5 月, 于淞南社区卫生服务中心肠道门诊腹泻病人肛拭样品中, 检测到 1 株 O139 群霍乱弧菌(编号为 BS-25); 2012 年 7 月, 华山医院宝山分院送检鉴定 1 株未知群的霍乱弧菌(编号为 7933)。

作者简介: 沈隽卿(1982—), 女, 主管技师, 学士。

1.2 仪器与试剂

定量荧光 PCR 仪(杭州博日公司)、ATB EX-PRESSION 1525 全自动细菌鉴定仪和比浊仪(法国梅里埃公司)、药敏纸片分配器(英国 Oxoid 公司)、电泳仪 JY300 型(北京君意东方电泳设备有限公司)、凝胶成像仪(Bio-Rad 公司)、霍乱弧菌诊断血清(中国药品生物制品鉴定所)、API20 E 生化鉴定板(法国梅里埃公司)、链霉素月桂基硫酸钠亚碲酸钾平板(以下简称“双洗”平板)、氧化酶试纸、山梨醇发酵管(上海市疾病预防控制中心)、哥伦比亚血琼脂、弧菌显色琼脂、MH 水解酪蛋白琼脂等(上海科玛嘉生物技术有限公司)、药敏纸片(英国 Oxoid 公司)、霍乱弧菌核酸检测试剂盒(上海之江生物有限公司)、引物(上海生工)、100bp DNA Ladder Marker 及 PCR 反应体系(日本 TaKaRa 公司)。

1.3 实验方法

① 革兰染色试验。② 生化反应检测: 根据《霍乱防治手册》(卫生部 1999)、WS 289—2008 标准, 并采用法国梅里埃 API20 E 生化鉴定板对分离到的菌株进行生化检测。③ 血清凝集反应(玻片法): 采用霍乱诊断血清对分离到的菌株进行血清凝集试验。④ 荧光定量 PCR 检测霍乱弧菌: 扩增体系 40 μ L, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min, 93 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环(单点荧光检测在 60 $^{\circ}$ C)。⑤ 对 2 株菌株分别进行 ctx、zot、ace、tcp 4 种毒力基因检测^[3]: 扩增体系 50 μ L, 反应条件为 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C

4 参考文献

- [1] 中国疾病预防控制中心. 新登记涂阳肺结核病人密切接触者检查指南[EB/OL]. http://www.chinacdc.cn/jkzt/crb/jhb/jszl_2221/201103/t20110311_28114.htm.
- [2] World Health Organization. Global Tuberculosis Control. WHO Report 2000[R]. Geneva: WHO, 2000.
- [3] 周梦雯, 张玲, 谭守勇, 等. 肺结核患者密切接触者结核患病情况调查[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(2): 259-260.
- [4] 刘崇欢. 阳江区 2006—2008 年涂阳肺结核患者密切接触者调查与分析[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(1): 152.
- [5] 张会民, 张联英, 吕广波, 等. 涂阳肺结核密切接触者结核感染和患病情况调查[J]. 河北医学, 2011, 33(20): 3152-3153.
- [6] 陈振兰, 曹磊. 健康教育处方对促进肺结核患者密切接触者进行主动检查的必要性[J]. 中国医药导报, 2010, 7(19): 204-205.

(收稿日期: 2013-08-23)

30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环, 引物序列见表 1。⑥ 药物敏感试验: 参照临床和标准化实验室 CLSI (NCCLS) 推荐 2009 版抗菌药物敏感性试验执行标准, 采用改良 K-B 纸片法对菌株进行药物敏感试验, 对照菌株为大肠埃希菌 (ATCC25922)。⑦ 溶血试验^[4]: 将分离到的菌株各取单一菌落接种于血琼脂平板上, 37℃ 培养 24 h 后, 观察溶血反应。⑧ 山梨醇发酵试验。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5 to 3)	产物片段大小(bp)
ctxA - F	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	564
ctxA - B	CGATGATCTTGGAGCATTCAC	
zot - F	TCGCTTAACGATGCGCGTTTT	947
zot - B	AACCCGTTTCACTTCTACCCA	
ace - F	TAAGGATGTGCTTATGATGGACACCC	316
ace - B	CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	
tcpA - F	CACGATAAGAAAACCGTCAAGAG	453
tcpA - B/r	CGAAAGCACCTTCTTCACACGTTG	

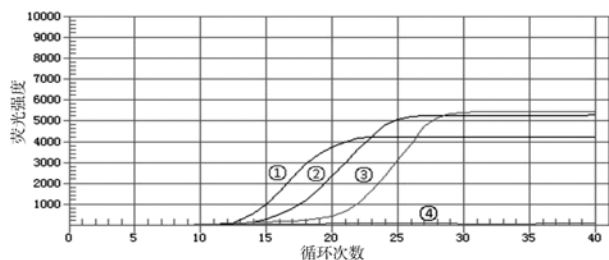
1.4 病例基本情况

BS-25 株的患者为宝山区淞南街道居民, 女。2012 年 5 月 1 日至崇明县参加喜宴聚餐, 除此之外无其他聚餐活动和不洁饮食史, 并将从酒席上带回的剩余油爆虾放入冰箱中冷藏, 5 月 5 日晚取出油爆虾加热后食用, 5 月 6 日发病。大便性状为黄色糊状便, 无腹痛、无呕吐、无发热等其他症状。

7933 株的患者为宝山区水产路某小区居民, 女, 入院做阑尾手术。2012 年 7 月 29 日采集阑尾渗液进行实验室病原学检测时检出, 临床使用头孢类抗生素后炎症好转。

2 结果

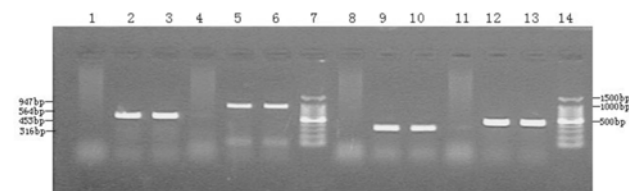
革兰阴性弧菌, 形态多样, 海鸥状等。生化反应均符合霍乱弧菌, BS-25 为 O139 群血清型, 7933 为 O77 群血清型 (霍乱弧菌 O1 群和 O139 群均不凝集), 霍乱弧菌核酸检测试验均为阳性 (图 1)。



①—BS-25; ②—7933; ③—霍乱弧菌核酸检测阳性对照;
④—阴性对照

图 1 2 株霍乱弧菌核酸检测试验结果

BS-25 的 4 种毒力基因均为阳性, 7933 均为阴性, 凝胶电泳结果见图 2; BS-25 对氨苄西林、萘啶酸、四环素、利福平、复方新诺明和链霉素等 6 种抗菌药物耐药, 7933 对利福平中度敏感 (表 2)。溶血试验结果 BS-25 不溶血, 7933 溶血; BS-25 山梨醇迟发酵, 7933 快发酵。



1 - O77 ctx⁻, 2 - O139 ctx⁺, 3 - (M045) O139 标准株 ctx⁺,
4 - O77 zot⁻, 5 - O139 zot⁺, 6 - (M045) O139 标准株 zot⁺,
7, 14 - Maker (100bp/条), 8 - O77 ace⁻, 9 - O139 ace⁺,
10 - (M045) O139 标准株 ace⁺, 11 - O77 tcp⁻, 12 - O139 tcp⁺,
13 - (M045) O139 标准株 tcp⁺

图 2 2 株霍乱弧菌毒力基因凝胶电泳结果

表 2 2 株霍乱弧菌的药敏试验结果

抗菌药物	抑菌圈 (mm)		结果判断	
	BS-25	7933	BS-25	7933
环丙沙星	23.42	36.68	S	S
氨苄西林	6.00	37.66	R	S
头孢噻吩	21.93	25.46	S	S
头孢噻肟	34.03	33.94	S	S
庆大霉素	22.00	21.82	S	S
萘啶酸	6.00	30.65	R	S
四环素	6.00	27.43	R	S
利福平	6.00	16.78	R	I
复方新诺明	6.00	27.73	R	S
氯霉素	15.53	32.23	I	S
头孢西丁	20.51	22.32	S	S
头孢呋辛	28.82	32.03	S	S
诺氟沙星	18.25	33.44	S	S
左氧氟沙星	24.88	34.94	S	S
链霉素	6.00	18.31	R	S

S: 敏感; R: 耐药; I: 中介

3 讨论

3.1 霍乱弧菌的鉴别

3.1.1 菌落形态 O139 群霍乱弧菌在双洗平板上半透明、扁平、黑心不明显, 与 O1 群霍乱弧菌黑心较明显不同。O77 群疑似霍乱弧菌在双洗平板上半透明、扁平、黑心明显。O139 群霍乱弧菌在弧菌显色培养基上中间略有凹陷、中间蓝色, 边缘透明, O77 群疑似霍乱弧菌在弧菌显色培养基上菌落微凸、中间蓝绿色, 边缘透明, 但不明显, 菌落比较大。

3.1.2 生化结果 2 例霍乱弧菌利用甘露糖、蔗糖、阿拉伯糖、淀粉结果都为“-、+、-、+”, 氧化酶试

验阳性。BS-25株山梨醇迟发酵,表明是流行株,有毒力,和毒力基因试验结果符合。7933株山梨醇快发酵,表明不是流行株。

3.1.3 常规荧光定量PCR结果和毒力基因检测

两者常规PCR检测霍乱弧菌核酸都为阳性,这与血清凝集试验结果符合,都属于霍乱弧菌属。O139群霍乱弧菌ctx、zot、ace、tcp 4种常见毒力基因的核酸检测都为阳性,与以上流行株结果相符合。有研究发现,霍乱流行时期的O139群霍乱弧菌感染者分离株检测的毒力相关基因为阳性,将毒力相关基因分型用于判断和区分O139群霍乱弧菌的流行株与非流行株也是可行的^[5]。而O77群霍乱弧菌毒力基因检测都为阴性,表明无毒性,与非流行株的结果相符合。

3.1.4 药敏试验结果 BS-25株有多重耐药的现象,7933株对利福平中度敏感,提示这种抗菌药物有耐药的趋向,对其余的抗菌药物则均为敏感。

3.2 加强监测,及时发现疫情

虽然非O1、O139群的霍乱弧菌通常不引起严重的腹泻,且未列入法定传染病,但是这类细菌在自然界中普遍存在,有时对人们的健康也造成了一定的危害,需要引起重视。而本株O139群霍乱弧菌的检出,说明我区仍然有霍乱发病及流行的潜在危险,而

且我区地处长江入海口,海水和淡水交汇处,应做好各种水源中霍乱弧菌的监测。患者大多是通过被污染的食品而感染,因此,必须搞好城镇卫生,加强疫情监测。本次疫情发生后,我区疾病预防控制中心立即组织对全区医疗卫生机构进行了霍乱弧菌知识及检测的业务培训,并加强对医疗机构的日常指导和质控,及时掌握流行动向。

4 参考文献

- [1] 罗朝成,谢一俊,张静. 霍乱流行态势及我国霍乱防控中存在的问题[J]. 传染病信息, 2008, 21(3): 153-154.
- [2] 燕勇,罗建勇,朱心强,等. 霍乱及霍乱弧菌检测技术研究进展[J]. 上海预防医学, 2012, 24(8): 459-462.
- [3] Singh DV, Sree Renjini Isac, Colwell RR. Development of a hexaplex PCR assay for rapid detection of virulence and regulatory genes in vibrio cholerae and vibrio mimicus[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(11): 4321-4324.
- [4] 古文鹏,伏晓庆,杨建斌,等. 2011年云南省中缅边境地区三起霍乱疫情菌株分子分型研究[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(6): 573-574.
- [5] 詹奎峰,王晓萍,郭维植,等. 霍乱弧菌毒力相关基因检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1727-1728.

(收稿日期:2013-05-17)

(上接第115页)

源的浪费,也使被接种者承受一定的接种风险,可能并不适用于常规免疫接种率较高的上海地区。建议强化免疫要因地制宜,应侧重于在常规免疫接种率相对较低的边远地区开展,以消除免疫空白,建立免疫屏障。另外,从上海市近年的麻疹病例构成看,成人和8月龄以下的未及接种龄的小儿是主要的发病群体,应重点考虑对这些人群的免疫策略,从而逐步实现消除和控制麻疹的目的。

4 参考文献

- [1] 马丽丽. 世界卫生组织美洲区1999—2000年9月阻断本土麻疹病毒传播的进展[J]. 中国计划免疫, 2001, 7(2): 102-108.
- [2] Global control and regional elimination of measles, 2000-2011[J]. MMWR, 2013, 62(2): 27-31.
- [3] Wilson N, Baker MG. Celebrating 50 years of polio elimination in New Zealand; but inadequate progress in eliminating other vaccine-preventable diseases[J]. N Z Med J. 2012, 125(1365): 67-74.
- [4] 许文波,朱贞,张珍英. 麻疹野病毒H1基因型在中国流

行的分析[J]. 中国计划免疫, 2003, 9(1): 1-8.

- [5] 陈志慧. 麻疹病毒流行株的基因变化与现行疫苗的预防效果[J]. 中国计划免疫, 2003, 9(1): 47-51.
- [6] Rota JS, Wang ZD, Rota PA, et al. Comparison of sequence of the H, F and N coding genes of measles virus vaccine strains[J]. Virus Res, 1994, 31(3): 317-330.
- [7] Tamin A, Rota PA, Wang ZD. Antigenic analysis of current wild-type and vaccine strains of measles virus[J]. J Infect Dis, 1994, 170: 795-801.
- [8] 张建华,卢亦愚,严菊英,等. 麻疹病毒抗原性变异及免疫保护效果研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(8): 935-937.
- [9] 孙英杰,刘春梅,LI Jin. 辽宁省麻疹病毒流行株血凝蛋白特性分析[J]. 疾病控制杂志, 2001, 5(2): 99-101.
- [10] 李淑华,居丽雯,谈逸云,等. 2005年上海市麻疹流行株血凝蛋白基因变异及其对抗原性的影响[J]. 中华传染病杂志, 2007, 25(8): 490-495.
- [11] 陈明文,庞武贵,谢科运. 2004—2006年玉林市麻疹疫苗强化免疫效果评价[J]. 职业与健康, 2008, 24(7): 662-663.

(收稿日期:2013-06-07)