

副溶血性弧菌分子分型的研究进展

曲业敏 马淑青 孙梅 刘海珠 常鑫 宋宇

作者单位: 264200 威海市, 大连医科大学附属威海市立医院检验科

通讯作者: 曲业敏, Email: 280928818@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.016

【摘要】 近年来副溶血性弧菌(VP)已成为沿海地区引发食源性疾病的主要病原菌。由于对 VP 的分子特征了解不够全面,在疾病发生时无法对菌株溯源,从而导致未能尽早控制 VP 引起的食物中毒。而传统的细菌分型技术已不能满足临床诊断和流行病学调查的需要,从分子水平上认识 VP 则变得越来越重要。分子分型技术以其分辨率高、特异性强、重复率好的特点,在分型技术上表现出越来越多的优势。目前,随机扩增多态性分析、脉冲场凝胶电泳、多位点序列分型等多种方法分子生物学分型技术已应用于 VP 的遗传进化关系及其群体遗传学特征的研究,对 VP 的预防和控制具有重要意义。

【关键词】 副溶血性弧菌; O3:K6 型; 分子分型

弧菌是一种菌体短小,弯曲成弧形,尾部带一鞭毛的革兰阴性(G⁻)菌,主要鱼贝类致菌包括溶藻弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)、创伤弧菌、鳃弧菌等。近年来,有关创伤弧菌脓毒症诊断的研究较为广泛^[1-3],而针对 VP 的研究较少。VP 是一种嗜盐菌,食用未加工成熟的海产品是人类感染 VP 的主要原因,可引起食物中毒和急性腹泻,也可引起伤口感染和菌血症。近年来海鲜类食品在市场广泛流通,导致该菌由沿海向内陆传播蔓延,甚至超过沙门菌和志贺菌,成为腹泻的首要病原菌^[4]。为了便于临床诊断、流行病学调查以及医院感染的监控,在临床应用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)、脉冲场凝胶电泳(pulse-field electrophoresis, PFGE)等分子分型技术进行 VP 分子流行病学的研究,为 VP 感染防治提供病原学依据,现将相关研究进展进行综述。

1 基本特性

1.1 形态及培养 VP 为 G⁻ 杆菌,属于弧菌科弧菌属,是一种多形态菌,其菌体呈杆状、弧状或丝状,无荚膜和芽胞。在液体培养基中大多数 VP 有单端鞭毛和侧鞭毛,以便于运动和黏附;而在半固体或枯稠的表面,它会在细胞周围产生许多无鞘的周生鞭毛,以利于细菌细胞的群聚。VP 对营养要求不高,但无法在无盐培养基上生长,最适浓度为 3.5%,超过 8% 则不能生长,耐碱怕酸。

2 致病性

VP 是一种重要的食源性病原菌,大部分 VP 并不致病,只有少部分菌株才有致病性。但研究表明,国内大部分临床来源的 VP 分离菌株是致病的,作为大流行株的 O3:K6 也是普遍存在的^[5]。VP 引起的疾病一般起病急、临床症状重,但其致死率较低。由 VP 引起的大部分胃肠炎可以通过自身免疫系统抑制,因此,患有肝脏疾病或免疫功能紊乱的群

体可能有生命危险^[6]。尽管大多数血清型 VP 是非致病性的,但研究表明,毒性基因可以通过水平转移的方式从不同属的致病性弧菌转移到无毒性的 VP^[7]。

目前关于 VP 致病机制的研究主要围绕其毒性因子展开。VP 的主要致病因子是溶血毒素,包括直接溶血毒素(TDH)和 TDH 相关溶血毒素(TRH),分别由 TDH 和 TRH 基因编码,具有溶血活性、肠毒素活性、心脏毒素活性及细胞毒素活性^[8]。VP 中有两套编码Ⅲ型分泌系统的基因簇,即 T3SS-1 和 T3SS-2,分别位于大小染色体上^[9]。T3SS-1 能够介导宿主细胞的自噬,与宿主细胞凋亡有关,对多种细胞株均具有毒性;而 T3SS-2 对部分细胞具有肠毒性。因此,Ⅲ型分泌系统也被认为是 VP 的主要致病因子。近年来发现了 VP 的Ⅵ型分泌系统(T6SS),该分泌系统能够增强细菌对外界环境的适应性,使细菌在菌群中处于生长优势,介导细菌对宿主细胞的致病性^[10]。Ⅵ型分泌系统的 T6SS-1 具有细胞黏附能力, T6SS-2 则具有细胞黏附和促细胞自噬两种能力。

3 分子分型技术的发展

VP 经典的分类依据是血清型分型,自 1996 年以来,全球范围内引发越来越多 VP 感染和暴发的菌株都属于大流行株的同源复合体。这种同源复合体的出现引起了人们对 VP 非典型性大流行株传播公共健康问题的关注^[11]。除了原始的 O3:K6 血清型外,学者们还鉴定出了至少 11 种其他的衍生体^[12]。因此血清学在追溯流行性的同源复合体传播上是有一定局限性的。随着生物技术的发展,随机引物聚合酶链反应(PCR)、限制性片段长度多态性分型、随机扩增多态性 DNA 分析(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、核糖分型、PFGE、MLST 以及多位点可变数目串联重复序列分析(multiple locus variable number of tandem repeats analysis,

MLVA)等多种分子生物学分型技术已成功应用于 VP 分子流行病学的研究^[13]。这些分子分型技术将有助于在全世界范围内进行食源性微生物流行病学研究。现针对几种常用的分子分型技术的研究应用进行阐述。

3.1 RAPD RAPD 技术是建立在 PCR 基础上的一种分子技术,可对整个未知序列的基因组进行多态性分析,在遗传图谱构建、群体遗传结构分析、DNA 指纹分析和基因定位等不同领域得到广泛应用。RAPD 利用一系列不同的具有 10 个左右碱基的单链随机引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分离,获得的电泳带型可用于比较细菌菌株的亲缘关系,从而反映基因组相应区域的 DNA 多态性。目前,我国大部分基层实验室只能开展 VP 常规的细菌分离培养及血清学鉴定,无法在基因组水平描述病原菌所致暴发或流行的遗传背景,并追溯传染源、查明传播途径。尽管 RAPD 可重复性和分型力不高,且不同实验室的结果不能比较,但其简便快速,且需要的基因组 DNA 少,不用事先了解细菌基因组序列就可以准确测出靶序列的特性,在疾病暴发流行时,是一种用于区分相关菌株和排除不相关菌株的良好技术^[14]。因此 RAPD 技术以其简便、快速、有效等特点,特别适用于在基层实验室应用。

3.2 PFGE PFGE 出现于 20 世纪 80 年代,用于分析大分子 DNA 片段,其重复性好、分辨力强,被称为细菌分子生物学分型技术的“金标准”^[15]。对比分析不同样品、不同地区食源性 VP 染色体 PFGE 条带图谱,以评价菌株之间的遗传多样性及环境菌株与分离自患者菌株的相关性,可对食源性疾病暴发进行早期预警,为疫情防控提供有力的技术保障。PFGE 的基本原理是不断改变凝胶上外加的脉冲电场方向,从而改变包埋在琼脂糖凝胶中 DNA 分子的泳动方向。DNA 分子越大则重新定向的时间越长,因此大 DNA 分子的变化比小 DNA 分子慢,从而按染色体大小在凝胶上呈现出不同的电泳带型。在一定程度上, DNA 电泳带的密度可以反映细菌内 DNA 的含量及 DNA 分子大小,最终达到分型目的。

PFGE 可直接或间接反映病原体变异分化的本质即 DNA 序列的改变,从而实现微观变化的宏观显示^[16]。Tenover 等^[17]按其电泳条带不同提出了有关 PFGE 图谱与测定菌株相关性的判别标准是图谱一致为相同菌株;有 1~3 条带的差异菌株;有 4~6 条带的差异菌株;或更多条带的差异菌株。因为细菌的高变异性,判断是否为同一菌株时允许存在变异,因此该标准尚存在局限性。Talon 等^[18]在解释 PFGE 图谱时提出 85% 以上条带相同的即为相同菌株,50% 以上条带不同则为不同菌株。美国 PulseNet 体系中的 6 家实验室联合建立了 PulseNet VP 有效快速的 PFGE 标准化分型技术。中国也在 2004 年 9 月正式加入了 PulseNet 网络,成立了 PulseNet China 实验室,建立了 PFGE 标准化方案和数据库^[19]。PFGE 方法与其他分型方法相比有着更高的分辨力和更好的可重复性,且结果稳定、更易于标准化,可以方便、及时地对不同地区、不同时间、不同致病性菌株或不能用 MLST 分型的菌株进行有效分型。同时,计算机凝

胶扫描和软件分析有助于创建病原菌 PFGE 图谱数据库,通过数据库的比对来判断被测菌株与相同菌属间的亲缘关系。PFGE 的缺点首先是耗时长,不适用于实验室大量样本分析;其次是试剂及设备价格非常昂贵;另外,很小的电泳条件改变就可以导致每条光谱带间距离的变化,因此不适用于不同实验室间结果的比较。

3.3 MLST MLST 是 1998 年为研究菌群基因结构而设计的一种高分辨率分型技术^[20]。MLST 通过对多个管家基因核酸序列的分析,依据等位基因的多样性确定菌株的序列型,并可通过互联网上的数据库对不同国家、不同地区分离的菌株进行比较,已成为一种确定全球细菌病原体(如脑膜炎奈瑟菌和金黄色葡萄球菌)的流行病学方法^[21-22]。早先的 MLST 研究旨在探讨 VP 新的大流行株的进化,研究者假定其是从一个共同的 O3:K6 进化而来^[23],研究主要局限于大流行株菌株,且只检测了 4 个管家基因,均位于染色体 I 上,而 VP 有 2 条染色体,使用 6~8 个基因有益于确定是否 2 条染色体都承受类似的进化压力。目前一般选择 6~10 个管家基因或广泛存在的毒性基因分别进行 PCR 扩增,若不同菌株间 PCR 产物的核苷酸序列完全一致,则将该序列类型认定为等位基因。这种数字化结果既准确又清晰,不同的等位基因将被指定不同的数字,而一个细菌的所有等位基因数字将构成等位基因谱,不同的等位基因谱组成不同的序列型(sequence type, ST),其分析数据可以通过互联网在全球范围进行比对,在监测全球的流行病上具有强大的优势。

González-Escalona 等^[11]的研究结果表明,MLST 适用于不同地区的 VP 菌株,采用 MLST 并对其进行了种群结构调查,确定了物种克隆扩增中重组/突变的影响。MLST 用所测定的管家基因核苷酸序列组合进行编码分型,可有效分析不同时间、不同地区临床分离株的遗传相关性,特别是多地域相关性微生物的流行病学、种内微进化、来源追踪和抗菌药物耐受研究,数据重复性及可比性好,可共享。MLST 产生的数据可用于细菌进化和种群研究,而不考虑其多样性、种群结构的演化^[24],已被临床微生物学家和流行病学家视为一种重要溯源与进化分析工具。以前的 MLST 研究说明了细菌属中的菌株间存在遗传亲缘关系,确定了基因重组及突变相关进化的重要性和基因水平转移事件在进化过程中的重要作用^[25-26]。但由于 MLST 主要通过进化过程中高度保守的管家基因变异对细菌进行分型,因此并不能区分关联度高的菌株,也不能有效鉴别遗传关系相近的不同血清型菌株^[27]。同时 MLST 需要测序仪器且测序费用较高,影响了其在医院的大量推广和普及,仅局限于在大型的全球性流行病学研究中心使用。

3.4 MLVA MLVA 是近年国外发展起来的以 PCR 为基础的快速分析多位点串联重复序列的新方法,是一种细菌二代分子分型方法。该方法通过区分基因组上多个具有多态性串联重复序列位点(vNTR)的拷贝数而对菌株进行分型^[28],不同的临床分离株可表现为不同的串联重复数,故 MLVA 结果可以数字化表示,便于不同实验室间比较。MLVA 分型

与血清学分型、PFGE 分型相关性好,不仅能够反映菌株间基因水平微小变异,同时结果以精确的数字化水平呈现,易于实验室内和实验室间的比对。MLVA 分型方法比 MLST 的试验费用低,可以不必测序就获得数字化结果,而数据传递方便性又与 MLST 一致。与 PFGE 相比,MLVA 在实验时间方面很有优势,且实验操作比 PFGE 简单,分辨效率更高。MLVA 方法不仅适用于进行国际化的比较,而且也适用于基层实验室的研究应用及进行全世界范围的流行病学研究,目前在国内一些大型研究中心已经开始得到应用。

4 展望

近年来,VP 引起的感染暴发逐渐增多,食物中毒的检出率逐渐升高,故相关部门应根据 VP 的流行及传播特点制定更加科学、完善的预防措施,加强对水产品销售、进货渠道及餐饮业卫生的管理。因此,建立一个从产地到餐桌对海产品进行监控的食品链检测体系是非常必要的。采用分子分型技术对菌株进行分型研究,对及时确定污染源,迅速处理食物中毒有关的应急突发事件和有效治疗具有突出意义。

5 参考文献

- 1 卢中秋,李景荣. 创伤弧菌脓毒症研究进展. 中华危重病急救医学, 2005, 17: 439-441.
- 2 卢中秋,卢才教,邱俏檬,等. 创伤弧菌脓毒症诊疗方案(草案). 中华危重病急救医学, 2008, 20: 4-6.
- 3 李海燕,梁欢,卢中秋,等. 抗菌药物对创伤弧菌脓毒症大鼠血清抗炎/促炎细胞因子的影响. 中华危重病急救医学, 2007, 19: 53-54.
- 4 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992 ~ 2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网. 卫生研究, 2004, 33: 725-727.
- 5 李薇薇,梅玲玲,唐震,等. 2007-2009 年中国副溶血性弧菌临床分离株分子特征分析. 中华预防医学杂志, 2014, 48: 44-52.
- 6 Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol*, 2007, 24: 549-558.
- 7 Waldor MK, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* O139 specific gene sequences. *Lancet*, 1994, 343: 1366.
- 8 Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, et al. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. *Infect Immun*, 2010, 78: 1772-1780.
- 9 Ono T, Park KS, Ueta M, et al. Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infect Immun*, 2006, 74: 1032-1042.
- 10 Cascales E. The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep*, 2008, 9: 735-741.
- 11 González-Escalona N, Martínez-Urtaza J, Romero J, et al. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J Bacteriol*, 2008, 190: 2831-2840.
- 12 Ansaruzzaman M, Lucas M, Deen JL, et al. Pandemic serovars (O3:K6 and O4:K68) of *Vibrio parahaemolyticus* associated with diarrhea in Mozambique: spread of the pandemic into the African continent. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 2559-2562.
- 13 刘丁. 细菌基因分型技术方法及其评价. 国外医学: 临床生物化学与检验学分册, 2002, 23: 220-222.
- 14 Wong HC, Liu CC, Pan TM, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates, obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan, by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1809-1812.
- 15 王丽丽,徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术(PFGE)在分子分型中的应用现状. 疾病监测, 2006, 21: 276-279.
- 16 丁水军. 脉冲场凝胶电泳技术及其在病原菌分子分型中的应用. 中国卫生检验杂志, 2009, 19: 962-964.
- 17 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.
- 18 Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*, 1996, 32: 135-145.
- 19 苗艳芳,黎明,李涛,等. 脉冲场凝胶电泳用于副溶血性弧菌的分子流行病学研究. 中国人兽共患病学报, 2010, 26: 935-938.
- 20 Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 3140-3145.
- 21 Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2006, 60: 561-588.
- 22 张金金,李迎慧,石晓路,等. 副溶血弧菌的多位点可变数目串联重复序列分型方法的研究. 实用检验医师杂志, 2012, 4: 211-215.
- 23 Chowdhury NR, Stine OC, Morris JG, et al. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 1280-1282.
- 24 Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*, 2003, 11: 479-487.
- 25 Feil EJ, Cooper JE, Grundmann H, Robinson DA, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *Bacteriol*, 2003, 185: 3307-3316.
- 26 Miragaia M, Thomas JC, Couto I, et al. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol*, 2007, 189: 2540-2552.
- 27 Manning G, Dowson CG, Bagnall MC, et al. Multilocus sequence typing for comparison of veterinary and human isolates of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 6370-6379.
- 28 Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 2005, 26: 2567-2582.

(收稿日期: 2016-06-30)

(本文编辑: 孙茜)