

文章编号 :1000 - 0615(2006)04 - 0525 - 06

## 暗纹东方鲀非 O1 霍乱弧菌的鉴定及毒力基因检测

杨鸢<sup>1</sup>, 俞菊华<sup>1</sup>, 陈 辉<sup>2</sup>, 方 苹<sup>2</sup>, 郭 闯<sup>2</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081;

2. 江苏省水产技术推广站, 江苏 南京 210036)

**摘要** 在对养殖暗纹东方鲀病害调查中, 从呈典型症状病鱼腹腔和肠道粘液中分离到 2 株(J-1 和 H-3)菌株, 经生化特性和血清型鉴定为非 O1 群霍乱弧菌(Non-O1 *Vibrio cholerae*)。注射、创伤和浸泡 3 种方式进行人工感染试验表现出较强的致病性, 出现症状与自然发病鱼相同。为进一步确认分离菌株的分类地位, 使用 P1、P2 引物, 以非 O1 群霍乱弧菌 N92001 菌株和 O1 群霍乱弧菌 N16961 菌株为对照, 对分离菌株进行 PCR 扩增, 得到 451bp 的 DNA 片段。根据现有霍乱弧菌肠毒素 *ctxA* 基因序列设计引物 P3、P4, 以 N16961 菌株为阳性对照, PCR 扩增结果均得到大小为 400 bp 的 DNA 片段。在对 H-3 菌株的扩增片段进行纯化、克隆和测序, 得到 407bp 序列, 该菌株与 N16961 菌株中肠毒素 *ctxA* 基因序列的完全一致, 证实该片段源于 *ctxA* 基因。进一步说明从暗纹东方鲀体内分离到的 J-1 和 H-3 菌株具有霍乱肠毒素 *ctxA*, 有一定的致病力。

**关键词** 暗纹东方鲀; 非 O1 群霍乱弧菌; 肠毒素 *ctxA*

中图分类号: Q 959.483; S 917 文献标识码: A

## Separation and determination on virulence genes of *Vibrio cholerae* in *Fugu obscurus*

YANG Yuan-jie<sup>1</sup>, YU Ju-Hua<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>2</sup>, FANG Ping<sup>2</sup>, GUO Chuang<sup>2</sup>

(1. Freshwater Fisheries Research Centre, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

2. Jiangsu Provincial Aquatic Technology Extension Station, Nanjing 210036, China)

**Abstract**: During the survey on diseases of *Fugu obscurus* from 2002 to 2004, two strains(J-1 and H-3) of pathogenic bacteria with typical symptoms were isolated from abdominal cavity and intestinal mucus of suffering *Fugu obscurus*. The two isolated strains were identified as non-O1 strains of *Vibrio cholerae* through biochemical test and serotype identification. It could be inferred that they are pathogens of bacterial enteritis of *Fugu obscurus* since the results of artificial infection are the same as the natural infection. In order to testify the classification of the isolated strains, the isolated strains were amplified by polymerase chain reaction(PCR) with two primers designed according to the sequence of *Vibrio*. The PCR products were DNA sequence of 451 bp. The result showed that systematic status between J-1, H-3 and N92001, N16961 was close. Enterotoxin with active subunit A named *ctxA* is one of the primary infection agents of *Vibrio cholerae*. While the pathogenicity is related with *ctxA*, the test of gene of enterotoxin is the most important step of diagnosis. Using N16961 strains as positive control, the same PCR DNA sequence of 400 bp was obtained in the PCR analysis. By sequencing and alignment, this 407 bp sequence of H-3 strains is identical with *ctxA*, which indicated that J-1 strains and H-3 strains were the pathogenic bacteria of *F. obscurus*. Bacterial diseases are common and frequent in process of aquaculture especially the intensive aquaculture. This paper shows introduces how to combine common method and PCR to isolate,

收稿日期 2005-12-08

资助项目: 中国水产科学研究院科研基金项目(2001-2-7)

作者简介: 杨鸢(1963-), 女, 江苏无锡人, 助理研究员, 从事水生动物病害防治研究。E-mail: yangyj@ffrc.cn

identify and study bacteria. The pollution of non-O1 strains of *V. cholerae* in aquatic product reflects in some way the degree of environmental pollution. Thus the study of pathogenicity is meaningful to evaluate if bacteria would cause disease and to limit its prevalence, so as to study and control the zoonosis.

**Key words:** *Fugu obscurus*; non-O1 *Vibrio cholerae*; enterotoxin ctxA

暗纹东方鲀 (*Fugu obscurus* Abe) 作为一种名贵养殖鱼类, 近年来因其特有的品质受到人们的重视。在大规模养殖过程中, 由于各种疾病不断出现, 特别是细菌性疾病暴发流行, 给河鲀养殖业造成了一定的经济损失。2002-2004年我们对江苏省太仓、姜堰、海安等地暗纹东方鲀养殖场的发病情况进行了调查, 对病症为细菌性肠炎的河鲀进行了病原菌的分离鉴定。从发病河鲀腹腔和肠道粘液中分离到2株(J-1和H-3)具有典型特征的菌株, 经生化特性和血清型鉴定为非O1群霍乱弧菌(non-O1 *Vibrio cholerae*)。为进一步鉴定病原菌及其致病性, 笔者采用不同的感染方法对河鲀进行人工感染试验, 其主要发病症状为肠壁呈水肿状, 充血发炎, 并产生淡黄色粘液。采用PCR法扩增特异性基因片段进行检测, 结果表明分离菌株含有霍乱肠毒素基因ctxA。由此证实该菌株对暗纹东方鲀具有一定的致病性。这对了解非O1群霍乱弧菌菌株的致病性并控制其传播和流行, 以及对养殖鱼类的致病菌检测、人畜共患疾病的研究和控制都具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**实验用鱼** 患病暗纹东方鲀分别取自江苏省太仓、姜堰、海安等地暗纹东方鲀养殖场, 健康暗纹东方鲀选自江苏省中洋水产集团公司, 体重( $21 \pm 3$ )g, 将暗纹东方鲀置于水族箱中暂养。水族箱大小为: 100 cm × 60 cm × 50 cm, 水深: 30 cm, 水温控制在( $25 \pm 2$ ) °C, DO > 5 mg·L<sup>-1</sup>, pH 7.0~8.0, 用空气泵充气增氧。暂养时投喂复合饵料, 实验时不投饵料。

**试剂和培养基** 碱性蛋白胨水培养基、碱性琼脂培养基、TCBS 琼脂培养基、营养琼脂培养基、微量生化鉴定管, 购自浙江省军区后勤部卫生防疫检验所; 诊断血清, 购于江苏省疾病预防控制中心; Taq 酶、蛋白酶 K、dNTPs、DNA Marker, 为上海申能博彩生物工程技术有限公司产品; 胶回收试剂盒、pCUM-T, 购自上海生物工程有限公司; TE 缓

冲液(pH 8.0)、SDS 等实验试剂由实验室配制。

**霍乱弧菌对照菌株** 非O1群霍乱弧菌N92001菌株, 购自江苏省疾病预防控制中心; O1群霍乱弧菌肠N16961菌株染色体(美国马里兰大学), 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所馈赠。

### 1.2 人工感染试验

将已鉴定的2株(J-1和H-3)菌株进行35 °C培养24 h, 斜面培养物用无菌生理盐水洗下, Densimat 浊度计比浊, 稀释菌液浓度至0.5 CFU·mL<sup>-1</sup>备用。选择实验室暂养1周以上无病症的健康暗纹东方鲀, 随机分为6组, 每组7尾, 同时设平行组, 分别进行注射感染、创伤感染和浸泡感染, 连续观察14 d。

**注射感染** 在鱼体胸鳍基部注射0.5 mL、浓度为0.5 CFU·mL<sup>-1</sup>溶液; 对照组注射0.5 mL 10% 无菌生理盐水。

**创伤感染** 将试验鱼体表刮伤, 置菌液浓度为 $2.0 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>水体中; 对照组为体表受伤鱼置于曝气自来水中。

**浸泡感染** 将体表无损伤实验鱼置菌液浓度为 $2.0 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>水体中; 将对照组实验鱼置于曝气自来水中。

### 1.3 细菌生化分离鉴定

现场采集具有典型病症的暗纹东方鲀, 无菌蒸馏水冲洗体表。灭菌吸管分别取肠道和腹腔粘液于碱性蛋白胨水培养液中, 35 °C培养18 h, 将培养物分别接种于碱性琼脂和TCBS 琼脂平皿, 35 °C 24 h 培养后进行观察, 选取优势单菌落培养物接种于营养琼脂斜面, 经35 °C 24 h 培养后, 4 °C 保存备用。按照《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[1]</sup>进行生理生化试验。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》<sup>[2]</sup>将分离菌株鉴定到属。

### 1.4 分子生物学鉴定

**细菌 DNA 抽提** 选取生长良好的单菌落接种营养肉汤培养基, 置37 °C 摇床振荡培养24 h, 收获细菌; 加TE 缓冲液467 μL、10% SDS 30 μL、20 mg·mL<sup>-1</sup>蛋白酶 K 3 μL, 55 °C 温育1 h; 用

等体积酚-氯仿抽提,转移上层水相(重复 2 次);加 1/10 体积醋酸钠,轻轻混匀;加 2 倍体积无水乙醇,置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  沉淀,使用前离心,70% 乙醇洗涤两次,55  $^{\circ}\text{C}$  烘干,20  $\mu\text{L}$  TE 溶解,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**引物设计、PCR 扩增及序列分析** 根据弧菌 16S rRNA 序列设计引物, P1: 5' - CGTAAGGGCCATGATGACTTGA - 3', P2: 5' - GAAAGCGTGGGTAGCAAACAGG - 3', 用以检测抽提的细菌 DNA。根据 O1 群霍乱弧菌 *ctxA* 基因序列设计 1 对扩增 *ctxA* 基因的引物, P3: 5' - ACTCAGACGGGATTTGTTAGG - 3' (位于 N16961 的 3982nt - 3962nt), P4: 5' - GCATGATGAATCCACGGCTCTT - 3' (位于 N16961 的 3597 nt - 3576 nt), 所有引物均由上海申能博彩生物工程技术公司合成。

PCR 反应体系总体积为 25  $\mu\text{L}$ , 内含  $1\times$  反应缓冲液,  $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $2.0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs, 0.5 U *Taq* 酶, 引物各  $0.4\ \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 模板 100 ng DNA。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 扩增 30 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物于 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。纯化以 H-3 菌株为模板, 引物 p3、p4 扩增的片段, 用胶回收试剂盒纯化, 克隆到 pUCm-T 载体中, 送上海申能博彩生物工程技术公司测序。

**序列分析及数据处理** 利用 Blast 软件包对克隆的序列在 GenBank 进行序列相似性分析。

## 2 结果

### 2.1 临床症状

养殖河鲀水温在 18  $^{\circ}\text{C}$  以上开始流行细菌性肠炎, 发病高峰水温为 25 ~ 30  $^{\circ}\text{C}$ 。主要病症为: 离群缓慢独游、食欲减退、对外界刺激反应迟钝。解剖观察: 肠壁局部水肿, 充血发炎; 肠道内无食, 只有淡黄色粘液; 患病严重的鲀肛门红肿、外突; 腹腔内积有淡黄色腹水, 整个肠壁呈水肿状, 全肠呈紫红色; 肝胰腺部严重炎症。组织病理检查可见肠粘膜坏死, 有大量坏死脱落的上皮细胞和小片的肠上皮组织; 粘膜下层及肌层的毛细血管有不同程度的扩张充血, 大量炎症细胞浸润。

### 2.2 致病性试验

注射感染组 48 h 后 4 尾鱼出现病症, 72 h 对外界刺激反应迟钝, 96 h 死亡 5 尾, 经解剖观察到

整个肠壁呈水肿状, 充血发炎, 有淡黄色粘液, 肝胰腺部严重炎症, 9 d 后全部死亡。创伤感染组 36 h 表现出游动无力, 对外界刺激反应迟钝, 7 d 后逐渐开始死亡, 14 d 后共死亡 4 尾。浸泡感染组 6 d 后对外界刺激反应迟钝, 10 d 后开始出现病症, 14 d 后共死亡 3 尾, 解剖死亡鱼可见肠壁局部水肿, 腹腔内有少量淡黄色腹水, 肠道充血发炎, 肠腔内有淡黄色粘液。对照组河鲀活动正常, 14 d 后全部存活, 经解剖和组织病理检查均未发现异常症状表现。

### 2.3 分离菌株生化特性鉴定

从患病暗纹东方鲀腹腔和肠道粘液中分离到 2 株菌 (J-1 和 H-3), 其生物学性状与伯杰氏细菌鉴定手册中霍乱弧菌描述基本一致<sup>[2]</sup> (表 1)。主要表现为: 革兰氏阴性, 弧形, 端生鞭毛, 氧化酶阳性, OF 试验为发酵型。碱性胨水培养基 35  $^{\circ}\text{C}$  培养 18 h 在培养基表面形成菌膜; 碱性琼脂 35  $^{\circ}\text{C}$  24 h 培养, 形成直径 1.5 ~ 2.0 mm 圆形、边缘整齐、表面光滑湿润的无色、半透明菌落; TCBS 琼脂 35  $^{\circ}\text{C}$  24 h 培养形成表面光滑湿润的黄色菌落。在无盐胨水中生长, 6% NaCl 胨水中生长缓慢, 8% NaCl 胨水中不生长; 还原硝酸盐; 产酸不产气; 不产  $\text{H}_2\text{S}$ ; VP 阴性;  $\beta$ -半乳糖苷酶 (ONPG) 阳性; 分解葡萄糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖、甘露醇; 不分解阿拉伯糖、鼠李糖、乳糖、水杨苷、肌醇、山梨醇; 赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶阳性; 精氨酸脱羧酶阴性; 弧菌抑制剂 O/129 (每片 10  $\mu\text{g}$  和 150  $\mu\text{g}$ ) 呈阳性; 血清学鉴定为非 O1 群霍乱弧菌。

### 2.4 PCR 检测结果

为进一步确认分离菌株的分类地位, 使用 P1、P2 引物, 以非 O1 群霍乱弧菌 (N92001) 菌株和 O1 群霍乱弧菌 (N16961) 菌株为对照, 对 J-1 和 H-3 菌株进行 PCR 扩增, 结果均能得到 451bp 的 DNA 片段 (图 1)。由此可以得出分离菌株 J-1 和 H-3 与非 O1 群霍乱弧菌 (N92001) 和 O1 群霍乱弧菌 (N16961) 菌株分类地位相近。

### 2.5 霍乱弧菌肠毒素 *ctxA* 基因

根据现有霍乱弧菌肠毒素 *ctxA* 基因序列设计引物 P3、P4, 以 N16961 菌株为阳性对照, 对分离菌株 J-1、H-3 进行 PCR 扩增, 结果均得到大小为 400 bp 的 DNA 片段 (图 2)。对 H-3 菌株的扩增片段进行纯化、克隆和测序, 得到 407 bp 序列, 并对序列进行同源性分析后可见分离菌株 H-3

与 O1 群霍乱弧菌 N16961 菌株中肠毒素 *ctxA* 基因序列的同源性为 100%(图 3)。证实该片段源于 *ctxA* 基因,进一步说明从患病暗纹东方鲀体内分

离到的 J-1 和 H-3 菌株含有霍乱肠毒素 *ctxA*, 具有一定的致病力。

表 1 分离菌株的生物学特性

Tab.1 Characteristic of isolated strains

测定项目 item	菌株 strains			
	J-1	H-3	N92001	霍乱弧菌 * <i>V. cholerae</i>
形态 cell shape	弧形	弧形	弧菌	弧菌
革兰氏染色 gram stain	-	-	-	-
鞭毛 flagellum	单鞭毛	单鞭毛	单鞭毛	单鞭毛
TCBS	黄	黄	黄	黄
氧化酶 oxidase	+	+	+	+
OF oxidation fermentatipn	F	F	F	F
动力 motility	+	+	+	+
斜面 slant	-	-	-	-
高层 butt	+	+	+	+
气体 gas	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-
0/12(每片 10 μg) disk	S	S	S	S
0/12(每片 150 μg) disk	S	S	S	S
0% NaCl	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+
6% NaCl	(+)	+	+	+
8% NaCl	-	-	-	-
硝酸盐还原 nitrate recovery	+	+	+	+
吲哚试验 indole production	+	+	+	+
VP voges proskauer	-	-	-	d
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	+	+	+	+
精氨酸脱羧酶 arginine	-	-	-	-
脲酶 urease	(+)	+	(+)	-
葡萄糖 glucose	+	+	+	+
蔗糖 sucrose	+	+	-	+
阿拉伯糖 arabinose	-	-	-	-
鼠李糖 rhamnose	-	-	-	-
乳糖 lactose	-	-	(+)	-
甘露糖 mannitol	+	+	+	d
麦芽糖 maltose	++	+	+	-
水杨苷 salicin	-	-	-	-
甘露醇 mannose	+	+	+	+
肌醇 inositol	-	-	-	-
山梨醇 sorbitol	-	-	-	NR
ONPG 反应 ONPG test	+	+	+	+
O1 群抗血清凝集 agglutinated by cholera O1 antiserum	-	-	-	d
0139 诊断血清 0139 blood serum diagnosis	-	-	-	-

注：“\*”：伯杰氏细菌鉴定手册中对霍乱弧菌描述；+”：阳性；-”：阴性；F”：发酵；S”：抑菌；(+)”：反应迟缓；d”：多于 10% 菌株阳性或阴性；NR”：表示手册中没有记载

Notes：“\*”：The description of *Vibrio cholerae* comes from Bergey’s manual of determinative bacteriology；+”：Positive. “-”：Negative；F”：Ferment；S”：Suppress the bacterium；(+)”：Delayed response；d”：More than 10% bacterium strains are positive or negative；NR”：No mention in the manual

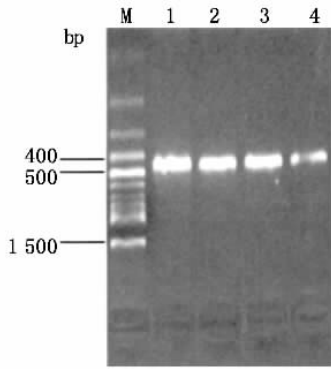


图1 16S rRNA PCR 结果

Fig.1 The results of 16S rRNA amplification

M DL1500 Marker ; 1 :J - 1 菌株 ; 2 :H - 3 菌株 ; 3 :N92001 菌株 ; 4 :N16961 菌株  
M DL1500 Marker ; 1 :J - 1 strain ; 2 :H - 3 strain ; 3 :N92001 strain ; 4 :N16961 strain

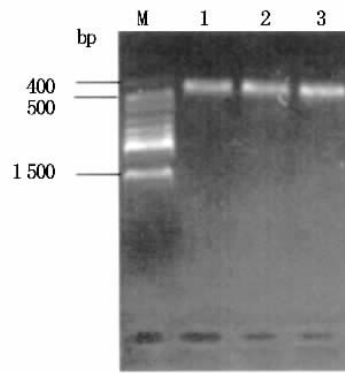


图2 ctxA 基因 PCR 扩增结果

Fig.2 The results of ctxA gene amplification

M DL1500 Marker ; 1 :J - 1 菌株 ctxA 基因产物 ; 2 :H - 3 菌株 ctxA 基因产物 ; 3 :N16961 菌株 ctxA 基因产物  
M DL1500 Marker ; 1 :J - 1 strain cultured of ctxA gene products ; 2 :H - 3 strain cultured of ctxA gene products ; 3 :N16961 strain cultured of ctxA gene products

H-3	(1)	GCATGATGAATCCACGGCTCTCCCTCCAAGCTCTATGCTCCGGAGGGAAAACCTGCCAAT	(60)
N16961	(3576)	GCATGATGAATCCACGGCTCTCCCTCCAAGCTCTATGCTCCGGAGGGAAAACCTGCCAAT	(3635)
H-3	(61)	CCATAACCATCTGCTGCTGGAGCAATATCTAAGTTACTGTAATATCTATCTCTGTAGCCC	(120)
N16961	(3636)	CCATAACCATCTGCTGCTGGAGCAATATCTAAGTTACTGTAATATCTATCTCTGTAGCCC	(3695)
H-3	(121)	CTATTACGATGTAATGTTCATCAAGCACCCCAAAATGAACTCGATACCATCCATATATT	(180)
N16961	(3696)	CTATTACGATGTAATGTTCATCAAGCACCCCAAAATGAACTCGATACCATCCATATATT	(3755)
H-3	(181)	TGGGAGTATGGAATCCCACCTAAAGCAGAAACTTCTTGTTCATCTGGATGAGGACTGTAT	(240)
N16961	(3756)	TGGGAGTATGGAATCCCACCTAAAGCAGAAACTTCTTGTTCATCTGGATGAGGACTGTAT	(3815)
H-3	(241)	GCCCCTAATACATCATTAAACGTTAAACATGTTGGGTGCAGTGGCTATAACATATATATAA	(300)
N16961	(3816)	GCCCCTAATACATCATTAAACGTTAAACATGTTGGGTGCAGTGGCTATAACATATATATAA	(3875)
H-3	(301)	TAAGTAGAATGACCAGACAATATAGTTTGACCCACTAAGTGGGCACTTCTCAAACAATT	(360)
N16961	(3876)	TAAGTAGAATGACCAGACAATATAGTTTGACCCACTAAGTGGGCACTTCTCAAACAATT	(3935)
H-3	(361)	GAGGTGAAACATATCCATCATCGTGCCTAACAAAATCCCGTCTGAGT	(407)
N16961	(3936)	GAGGTGAAACATATCCATCATCGTGCCTAACAAAATCCCGTCTGAGT	(3982)

图3 H-3 菌株 ctxA 基因序列与 01 群霍乱弧菌 N16961 菌株 ctxA 基因序列的比较  
Fig.3 Alignment of ctxA gene from Vibrio cholerae H-3 strain and N16961 strain

### 3 讨论

霍乱弧菌的主要致病因子之一是霍乱肠毒素<sup>[3]</sup>,它由一个A亚单位基因和5个B亚单位基因组成的多聚体。A亚单位为具有毒性的单位,是毒素的活性部份,它能激活肠细胞的腺苷酸环化酶,B亚单位为结合单位,是毒素的抗原部分,它将毒素结合至肠上皮细胞的受体神经苷脂GMI上<sup>[4]</sup>。当霍乱弧菌进入养殖动物消化道后,粘附于肠粘膜表面迅速繁殖,并产生霍乱毒素,毒素作用于肠粘膜促使肠液过量分泌,引起肠道发炎等病症。研究表明能产生肠毒素的菌株与霍乱弧菌的血清型无关<sup>[5]</sup>,无论是O1群菌株还是非O1群菌株都可同时携带多种毒力因子,使其具有潜在的致病性<sup>[6,7]</sup>。由于致病性总是与产毒的菌株有关,因此,产毒素菌株的检测是诊断的重要步骤。目前检测肠毒素的方法主要有兔肠袢结扎试验、乳鼠灌胃法、细胞培养法和ELISA等,操作繁杂,费时耗力,直接影响研究的深入。本研究应用PCR扩增致病性非O1霍乱弧菌的毒力基因,及时检测分离菌株是否携带肠毒素 $ctxA$ 基因,这对了解菌株的致病力,评价检测菌株能否引起疾病流行和控制其传播具有重要的临床意义,同时也为流行病学的研究提供较为有力的证据。

利用微生物分子遗传特有的稳定性,从细菌的基因水平入手,采用PCR法,快速扩增特异性基因片段进行检测,不仅提高了病原微生物菌株种属的鉴定和分型速度,而且可以从疑似带菌且无症状的鱼体检测出病原,该方法具有较高的选择性和特异性<sup>[8]</sup>。用常规方法和PCR法平行开展病原菌、菌株分型和致病性检测,不仅可以提高效率,减少各种污染机会,也降低了检测成本,且具有特异、敏感、通用、简便、快速和经济的优点,有一定的临床实验诊断应用价值。

细菌性疾病是水产养殖过程中的常见病和多发病,在养殖的水产动物中,曾分离到致病性非O1型霍乱弧菌<sup>[9,10]</sup>。而在对外环境水体的检测中,陈爱贞等<sup>[11]</sup>、于兵等<sup>[12]</sup>也曾报导具有潜在的非O1群霍乱弧菌的污染。陈学军等<sup>[13]</sup>在检测国内和进口水产品中霍乱弧菌的阳性率为0.06%

和3.2%。非O1型霍乱弧菌存在于水体中,主要是通过污染的水源或食物经口传染。因此,研究水体及水产品霍乱弧菌污染情况,在一定程度上反映了环境生物污染的情况,这对水产品疫源监测和判断具有重要的意义。

感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制所阚飙教授为实验提供霍乱弧菌N16961染色体!

### 参考文献:

- [1] 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法[M].北京:科学出版社,1978.
- [2] 布坎南 R E,吉本斯 N E.伯杰氏细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1974.
- [3] Mekalanos J J, Swartz D J, Pearson G D, et al. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development[J]. Nature, 1983, 306: 551.
- [4] 曹诚,李平,李杰之,等.霍乱毒素A、B亚基基因比例表达的精确调节[J].军事医学科学院院刊, 2000, 24(2): 38-90.
- [5] Varela P, Pollevick G D, Ravas M, et al. Direct detection of *Vibrio cholerae* in stool samples[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32: 1246.
- [6] 段广才,高守一,祁国明,等.霍乱弧菌O139与O1及非O1菌关系的研究[J].中华微生物学和免疫学杂志, 1995, 15: 230-233.
- [7] 何浙生.医学细菌毒力岛的研究近展及其意义[A].浙江省预防医学会微生物生态学一届五次医学感染控制一届三次学术交流会议论文集[C]. 2001. 71-72.
- [8] Carlos R. 16S rRNA gene sequence analysis of photobacterium dem selae and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(7): 2942-2946.
- [9] 郑国兴.养殖对虾弧菌致病菌-非O1群霍乱弧菌的生物学性状与致病性[J].水产学报, 1986, 10(2): 195-203.
- [10] 樊海平,黄晓风,徐娟儿.养殖欧洲鳗鲡粘病的研究[J].中国水产科学, 1998, 21(2): 68-72.
- [11] 陈爱贞,蔡戴崧,朱素仪,等.佛山市外环境水体非O1霍乱弧菌生物学特性和流行病学研究[J].中华预防医学杂志, 2004, 38(1): 47-49.
- [12] 于兵,麻丽丹,李劲革,等.丹东口岸国境外环境水体中检出O139群霍乱弧菌[J].中国国境卫生检疫杂志, 2004, 27(4): 204-205.
- [13] 陈学军,谢昭聪,何建凡.水体及水产品霍乱弧菌疫源监测研究[J].实用预防医学, 2002, 9(1): 69-70.