

研究报告

杭州市1株不产毒霍乱弧菌食品分离株的基因组特征与溯源研究

俞骅¹,高佳佳²,朱炜²,郑伟¹,郑之北¹,吴金飞²,王毅意²,潘高翔²,汪皓秋¹

(1. 杭州市疾病预防控制中心,浙江 杭州 310021;2. 滨江区疾病预防控制中心,浙江 杭州 310051)

摘要:目的 研究杭州市1株不产毒小川血清型霍乱弧菌食品分离株与国内外食品和临床分离株的溯源关系及其分子特征。方法 采用荧光定量聚合酶链式反应检测菌株毒力基因分布,使用高通量测序获得基因组序列,使用生物信息学方法鉴定其多位点序列分型(MLST)型别。将101株食品和临床分离株基因组序列比对到参考基因组N16961获得单核苷酸突变位点(SNV),去除重组并构建进化树,分析食品分离株和近源菌株的基因分布情况。结果 该食品分离株是不产霍乱毒素和产毒素共调菌毛的霍乱弧菌(CNTP),MLST分型结果为ST1480,与杭州地区流行的ST75型CNTP菌株属于同一克隆群。该菌属于进化树L3b.1分支,与杭州2011年临床分离株(HZ11-1,HZ11-2)高度同源,去除重组后仅有26个SNVs位点差异。结论 从甲鱼涂抹拭子中检出与杭州地区流行的CNTP高度同源的菌株,杭州地区散发病例感染来源可能与爬行类食品污染因素有关,应加强对其养殖场所及销售场所进行消毒。

关键词:霍乱弧菌;霍乱毒素;多位点序列分型;基因组进化树

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2023)04-0491-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.04.001

Genomic characteristics and source tracing of a non-toxigenic *Vibrio cholerae* food isolate in Hangzhou

YU Hua¹, GAO Jiajia², ZHU Wei², ZHENG Wei¹, ZHENG Zhibei¹, WU Jinfei²,
WANG Yiyi², PAN Gaoxiang², WANG Haoqiu¹

(1. Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310021, China; 2. Binjiang District Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective To study the relationship and molecular characteristics of a non-toxic ogawa serotype *Vibrio cholerae* food isolate with food and clinical isolates at home and abroad. **Methods** Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and high-throughput sequencing was applied to obtain virulent genes distribution and genome sequence. Bioinformatic methods were used to identify their multi-locus sequencing typing (MLST) types. One hundred and one isolates genomes were mapped to reference genome *Vibrio cholerae* N16961 to obtain the single nucleotide variant (SNV). All alignment was applied to construct the evolutionary tree after removing recombination. Comparative genome analysis was applied to the genes presence and absence in food isolates and close strains. **Results** The food isolate was a cholera toxin negative and toxin-coregulated pilus positive (CNTP) strain of *Vibrio cholerae*. The MLST type was ST1480 which belonged to the same clonal complex of the ST75 CNTP strain prevalent in Hangzhou. It was in the branch of L3b.1 in the phylogenetic tree, and highly homologous to clinical isolates in 2011 (HZ11-1, HZ11-2). After removing the recombination, there were only 26 different SNVs. **Conclusion** The food isolate was highly close to the clones of the CNTP *Vibrio cholerae* L3b.1 branch in Hangzhou. The source of infection in the sporadic cases in Hangzhou may be related to the contamination of reptile so that the disinfection of its breeding sites and sales sites should be strengthened.

Key words: *Vibrio cholerae*; cholera toxin; multi-locus sequencing typing; genomic phylogeny

收稿日期:2021-10-28

基金项目:杭州市科技发展计划(20191203B141);杭州市医学重点学科建设项目资助

作者简介:俞骅 男 副主任技师 研究方向为病原细菌

E-mail:indexofire@gmail.com

通信作者:汪皓秋 男 主任技师 研究方向为病原微生物的分子

分型与溯源 E-mail:wanghaoqiu@126.com

霍乱是我国传染病防治法规定的甲类传染病,其病原体是霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)^[1]。历史上O1群古典生物型霍乱弧菌曾引发6次世界性的霍乱大流行。第7次霍乱世界大流行^[2]是由产霍乱毒素(Cholera toxin, CT)和毒素共调菌毛(Toxin-coregulated pilus, TCP)的O1与O139群埃尔托生物

型霍乱弧菌(CT positive and TCP positive, CPTP)引起^[3]。

杭州地区的霍乱疫情随着近年来卫生环境的改善,一直处于低流行状态^[4]。但2006年由CT阴性和TCP阳性的O1/O139群霍乱弧菌(CT negative and TCP positive, CNTP)引起的散发肠道腹泻疾病持续在杭州流行,并于2009年出现流行高峰^[5]。杭州地区的CNTP菌株主要包括两个克隆群(L3和L9)^[5],由于其缺失霍乱毒素编码基因(*Cholera toxin encoding gene, ctxAB*),属于不产毒霍乱弧菌。因其携带*tcpA*,临床上以散发轻、中度腹泻症状为主,其感染途径尚不明确。杭州在水体环境检出过O1/O139群CNTP霍乱弧菌^[6],而食品中非O1/O139群霍乱弧菌^[7]阳性率较高。本研究对2020年甲鱼体表涂抹物中分离的O1小川血清型CNTP菌株进行基因组层面研究,分析其与临床CNTP分离株的溯源关系和分子特征,探讨杭州CNTP食源性传播的可能性。

1 材料与方法

1.1 菌株分离鉴定

2020年4~10月购买市售甲鱼、牛蛙等两栖类食品共计70份。采其体表及泄殖腔涂抹物,接种于碱性蛋白胨水(广东环凯,025010)中,42.5℃培养8h,吸取增菌液表层0.2~10mL碱性蛋白胨水,36℃培养8h。增菌液划线接种于四号琼脂平板(杭州滨和,200715)和硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂平板(广东环凯,025020),36℃培养24h。挑取可疑菌落进行革兰氏染色镜检、氧化酶及黏丝实验,符合者采用霍乱弧菌血清鉴定试剂(日本生研,200396)进行血清分型,对鉴定为霍乱弧菌O1/O139群的菌株接种至Luria Bertani肉汤(LB肉汤)增菌,36℃培养16h,取1mL肉汤采用热裂解法提取细菌核酸,以荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative polymerase chain reaction, qPCR)方法检测*ctxAB*毒力基因(北京卓成惠生,A5194)和*tcpA*基因^[8]。

表1 101株O1小川型霍乱弧菌本地菌株和NCBI公共数据库中菌株的Meta信息、MLST型别、*ctxA/tcpA*毒力基因分布和基因组进化分支信息

Table 1 Meta data, MLST type, *ctxA/tcpA* gene distribution and genomic information of 101 O1 ogawa *Vibrio cholerae* local strains and strains in NCBI public databases

编号	菌株编号	分离年份	分离地区	来源	样本	ST型	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	NCBI登记号	谱系
1	HZ01-32	2001	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRN01	L3b.2
2	HZ03-1	2003	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRO01	L3b.2
3	HZ03-4	2003	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRQ01	L3b.2
4	HZ03-5	2003	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRR01	L3b.2
5	HZ03-9	2003	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRS01	L3b.2
6	HZ03-12	2003	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRP01	L3b.2

1.2 基因组测序

挑取鉴定为O1群小川血清型霍乱弧菌单克隆接种于Muellar-Hinton肉汤(MH肉汤)36℃培养18h,用QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen, 51304)提取基因组DNA,采用Nextera XT DNA Library Preparation(illumina, FC-131-1024)试剂盒构建文库, Miseq Reagent v3 PE300(illumina, MS-102-3003)试剂盒在illumina Miseq测序平台进行高通量测序。

1.3 基因组组装及基因扫描

采用sra-tools v2.10.9^[9]下载并生成NCBI SRA公共数据库中O1群食品和环境来源的霍乱弧菌^[10-11]基因组原始测序数据。采用fastqc v0.11.9^[12]工具对测序下机数据和公共数据库基因组数据进行质控;使用基于spades v3.14.1^[13]组装软件的shovill v1.1.0^[14]工具进行基因组组装,使用trimmomatic v0.39^[15]软件去除测序接头和低质量序列;采用prokka v1.14.6^[16]进行基因组注释;mlst v2.19.0^[17]工具进行insilico MLST分型;采用BIGSdb^[18]的BURST工具分析近源ST型别所在克隆群;采用abricate v1.0.1^[19]以VFDB^[20]数据库对NCBI SRA公共数据库中基因组序列进行计算机模拟毒力基因扫描(insilico virulent gene scanning)。具体分析流程参见<https://github.com/indexofire/CNTP-pipeline>。

1.4 基因组进化树构建及比较基因组分析

采用snippy v4.6.0^[21]软件以霍乱弧菌N16961(CP028827.1,CP028828.1)为参考基因组,将84株2001—2012年杭州地区CNTP临床分离株、1株本地CNTP食品分离株和16株国外食品和环境分离株共计101株O1群小川血清型霍乱弧菌基因组进行比对分析(菌株清单见表1),获得SNVs位点。用Gubbins v2.4.1^[22]进行重组分析,对核心基因组去除重组序列后使用raxml v8.2.12^[23]构建进化树(model=GTR+GAMMA, bootstrap=1 000),使用ggtree^[24]绘制进化树。采用roary v3.13.0^[25]进行近源临床株与食品分离株比较基因组分析,Venn Diagram^[26]绘制韦恩图。

续表

编号	菌株编号	分离年份	分离地区	来源	样本	ST型	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	NCBI登记号	谱系
7	HZ04-1	2004	杭州	腹泻患者	肛拭	172	-	+	QZVF01	L9.1
8	HZ04-6	2004	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRT01	L3b.2
9	HZ05-12	2005	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRU01	L3b.2
10	HZ05-13	2005	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZRV01	L3b.2
11	HZ05-14	2005	杭州	腹泻患者	肛拭	173	-	+	QZVG01	L9.2
12	HZ06-6	2006	杭州	腹泻患者	肛拭	173	-	+	QZVI01	L9.2
13	HZ06-8	2006	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZRZ01	L3b.4
14	HZ06-11	2006	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZRW01	L3b.4
15	HZ06-18	2006	杭州	腹泻患者	肛拭	172	-	+	QZVH01	L9.1
16	HZ06-21	2006	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZRY01	L3b.4
17	HZ07-3	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSF01	L3b.4
18	HZ07-4	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSG01	L3b.4
19	HZ07-6	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	173	-	+	QZVK01	L9.2
20	HZ07-13	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZSB01	L3b.2
21	HZ07-16	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSC01	L3b.4
22	HZ07-18	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZSD01	L3b.2
23	HZ07-19	2007	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSE01	L3b.4
24	HZ08-1	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	173	-	+	QZVL01	L9.2
25	HZ08-3	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSQ01	L3b.4
26	HZ08-4	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSR01	L3b.4
27	HZ08-6	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSS01	L3b.4
28	HZ08-7	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZST01	L3b.4
29	HZ08-8	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZSU01	L3b.2
30	HZ08-10	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSH01	L3b.4
31	HZ08-15	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSK01	L3b.4
32	HZ08-16	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSL01	L3b.4
33	HZ08-19	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSM01	L3b.4
34	HZ08-20	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSN01	L3b.4
35	HZ08-21	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSO01	L3b.4
36	HZ08-22	2008	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSP01	L3b.4
37	HZ09-6	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTT01	L3b.4
38	HZ09-7	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTU01	L3b.4
39	HZ09-8	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTV01	L3b.4
40	HZ09-9	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTW01	L3b.4
41	HZ09-13	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSX01	L3b.4
42	HZ09-14	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZSY01	L3b.2
43	HZ09-15	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZSZ01	L3b.4
44	HZ09-16	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTA01	L3b.4
45	HZ09-17	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTB01	L3b.4
46	HZ09-18	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTC01	L3b.4
47	HZ09-19	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTD01	L3b.4
48	HZ09-20	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTE01	L3b.4
49	HZ09-21	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTF01	L3b.4
50	HZ09-23	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTG01	L3b.4
51	HZ09-24	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTH01	L3b.4
52	HZ09-25	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTI01	L3b.4
53	HZ09-26	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTJ01	L3b.4
54	HZ09-27	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTK01	L3b.4
55	HZ09-28	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTL01	L3b.4
56	HZ09-29	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZTM01	L3b.2
57	HZ09-31	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTN01	L3b.4
58	HZ09-32	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTO01	L3b.4
59	HZ09-33	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTP01	L3b.4
60	HZ09-34	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	176	-	+	QZVM01	L9.1
61	HZ09-36	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	176	-	+	QZVN01	L9.1
62	HZ09-38	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTQ01	L3b.4
63	HZ09-39	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTR01	L3b.4
64	HZ09-40	2009	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTS01	L3b.4
65	HZ10-5	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUD01	L3b.2
66	HZ10-6	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUE01	L3b.2
67	HZ10-9	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUF01	L3b.2
68	HZ10-11	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZTX01	L3b.2
69	HZ10-12	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTY01	L3b.4
70	HZ10-14	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZTZ01	L3b.4

续表

编号	菌株编号	分离年份	分离地区	来源	样本	ST型	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	NCBI登记号	谱系
71	HZ10-15	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZUA01	L3b.4
72	HZ10-16	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZUB01	L3b.4
73	HZ10-18	2010	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUC01	L3b.2
74	HZ11-1	2011	杭州	腹泻患者	肛拭	182	-	+	QZUG01	L3b.1
75	HZ11-2	2011	杭州	腹泻患者	肛拭	182	-	+	QZUH01	L3b.1
76	HZ11-3	2011	杭州	腹泻患者	肛拭	170	-	+	QZUI01	L3b.2
77	HZ11-6	2011	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZUJ01	L3b.4
78	HZ11-7	2011	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZUK01	L3b.4
79	HZ12-1	2012	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUL01	L3b.2
80	HZ12-2	2012	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUM01	L3b.2
81	HZ12-3	2012	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUN01	L3b.2
82	HZ12-4	2012	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZUO01	L3b.4
83	HZ12-5	2012	杭州	腹泻患者	肛拭	75	-	+	QZUP01	L3b.4
84	HZ12-6	2012	杭州	腹泻患者	肛拭	169	-	+	QZUQ01	L3b.2
85	HZ20-124	2020	杭州	食品	甲鱼	1480	-	+	JAGWDN01	L3b.1
86	TC22	2006	泰国	食品	牡蛎	NF*	-	-	ERR1485221	L9
87	TC183	2006	泰国	食品	虾	NF	-	-	ERR1485223	L9
88	MK14	2011	泰国	环境	水样	NF	-	-	ERR1485263	L9
89	4T5	2011	泰国	环境	水样	NF	-	-	ERR1485265	L9
90	TY8	2013	泰国	食品	虾	NF	-	-	ERR1485314	L9
91	TY6	2013	泰国	食品	虾	NF	-	-	ERR1485318	L9
92	Fish1	2017	坦桑尼亚	食品	鱼	69	+	+	ERR3039943	L1
93	Fish2	2017	坦桑尼亚	食品	鱼	69	+	+	ERR3039944	L1
94	Fish3	2017	坦桑尼亚	食品	鱼	69	+	+	ERR3039945	L1
95	Fish4	2017	坦桑尼亚	食品	鱼	69	+	+	ERR3039946	L1
96	Plankton1	2017	坦桑尼亚	其他	浮游生物	69	+	+	ERR3039947	L1
97	Plankton2	2017	坦桑尼亚	其他	浮游生物	69	+	+	ERR3039948	L1
98	Plankton3	2017	坦桑尼亚	其他	浮游生物	69	+	+	ERR3039949	L1
99	Water1	2017	坦桑尼亚	环境	水样	69	+	+	ERR3077564	L1
100	Water2	2017	坦桑尼亚	环境	水样	69	+	+	ERR3077565	L1
101	Water3	2017	坦桑尼亚	环境	水样	69	+	+	ERR3077566	L1

注:*MLST数据库中尚未分配的ST型别;+代表存在,-代表不存在

2 结果

2.1 菌株鉴定及基因组测序

共检出 28 株霍乱弧菌,其中 23 株为非 O1/O139 群、4 株为 O1 群稻叶血清型、1 株为 O1 群小川血清型(从 1 份甲鱼体表和泄殖腔涂抹物中分离,菌株编号 HZ20-124)。该菌基因组大小为 4.07 M(126 个 contigs, N50 为 246 527 bp)。MLST 型别为数据库未包含的新型,将其等位基因提交至 pubMLST 数据库后分配为 ST1480 型。该型别 BURST 分析与 ST75 等型别同属一个克隆群(图 1)。qPCR 毒力基因结果显示该菌 *ctxAB* 基因为阴性,*tcpA* 基因阳性。毒力基因扫描结果表明其不携带 *ctxAB*,但具有完整的 *tcpA* 基因,属于 CNTP 霍乱弧菌。

2.2 基因组 SNVs 位点及进化溯源分析

101 个 O1 群霍乱弧菌基因组去除重组后共获得 SNVs 位点 23 556 个。生成进化树包含 3 个聚类 L1、L3 和 L9。国外 L1 聚类包含国外食品与环境中 CPTP 菌株;L3 聚类包含杭州本地 CNTP 临床和食品分离株,又分成 L3b. 1、L3b. 2 和 L3b. 4 分支,L9 聚类包含 L9、L9. 1 和 L9. 2 分支,其中 L9 分支包含国外食品与环境中 CNTN 菌株,而 L9. 1 和

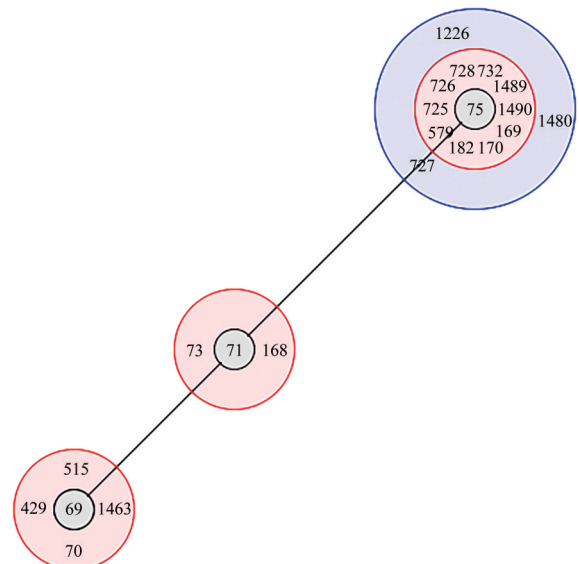


图 1 HZ20-124 分离株 ST1480 型、ST75 型及 ST 型相关克隆群 BURST 关系图

Figure 1 BURST analysis of ST1480 (HZ20-124), ST75 and all other relative ST types in the same complex clone

L9.2 分支包含杭州 CNTP 临床分离株。进化树中杭州食品 CNTP 菌株 HZ20-124 位于 L3b. 1 分支,与 HZ11-1 和 HZ11-2 处于同一簇(图 2)。三者相

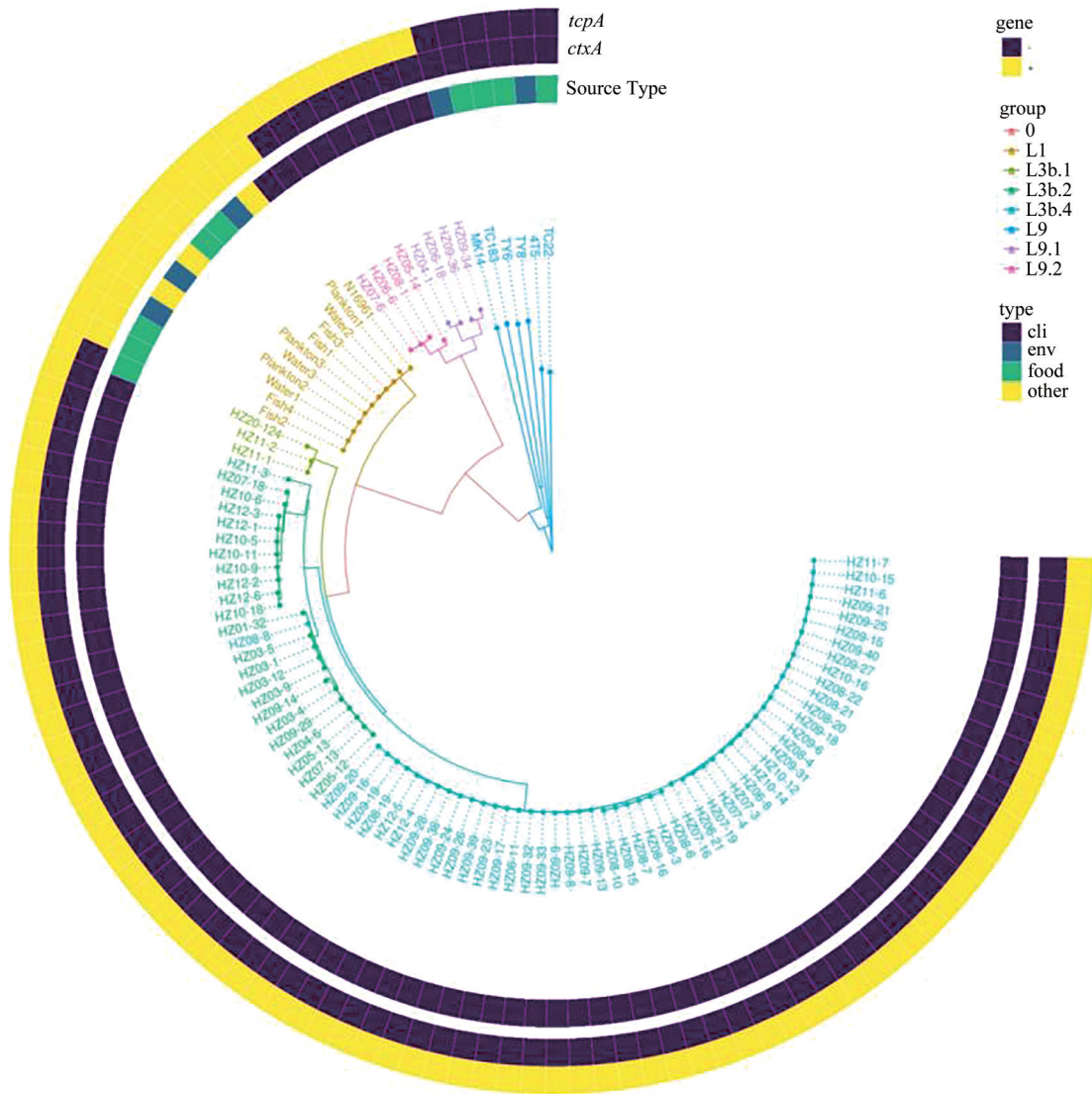


图2 101个O1小川血清型霍乱弧菌基因组(16个国外小川血清型食品、环境分离株与杭州84个临床分离株和1个食品分离株)进化树与样本来源、毒力基因分布的相关信息

Figure 2 101 O1 ogawa *Vibrio cholerae* strains (16 food and environmental isolates from other country, 84 clinical and 1 foodborne isolates in Hangzhou, China) genomic phylogeny, sample source and virulence genes distribution

差26个SNVs位点,基因组序列高度近源。比较基因组分析表明,HZ20-124携带而HZ11-1和HZ11-2不携带的基因有133个,其中15个可被注释的功能基因。差异基因分布韦恩图参见图3。

3 讨论

产毒霍乱弧菌引起的水源性肠道传染病在全球范围内大流行。近年来随着环境卫生的改善,杭州地区的霍乱发病率一直处于较低水平,但小川血清型CNTP霍乱菌株在散发腹泻患者中持续检出。在水体和食品中分离的霍乱弧菌一般分离为非O1/O139型不产毒霍乱弧菌。因此杭州本地的腹泻患者CNTP病原体来源值得研究。

2001年以来杭州发生3个型别的L3b进化分支的CNTP为病原体导致的散发腹泻,提示本地存

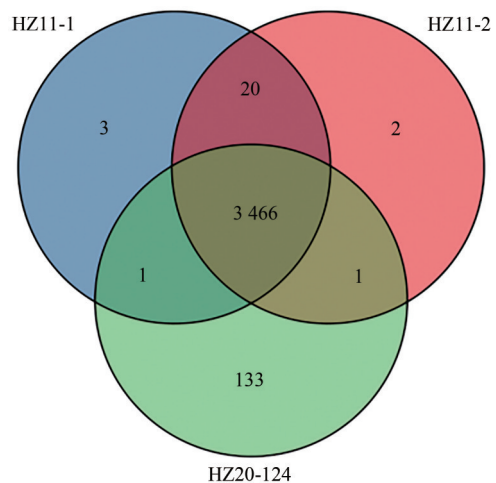


图3 3株L3b.1分离株(HZ11-1、HZ11-2和HZ20-124)基因组携带相似基因与特异基因差异韦恩图

Figure 3 Venn diagram based on genes absence and presence of three L3b.1 isolates (HZ11-1, HZ11-2 and HZ20-124)

在明确污染源。其中 L3b. 2 型在 2001—2012 年流行,而 L3b. 4 型从 2006 年起出现并于 2009 年引起本地暴发流行。二者致病性差异主要为 L3b. 4 携带弧菌致病毒力岛 VSP-1^[5],这可能与近年来患者数量明显增加有关。而 L3b. 1 型菌株最早可以追溯到 20 世纪 60 年代土库曼斯坦和 80 年代俄罗斯地区,提示杭州市该型菌株来源可能与中亚地区的输入有关。

通过对两栖爬行类动物如甲鱼等易携带弧菌的食品开展监测,于 2020 年首次在杭州市售甲鱼中检出小川血清型的 CNTP 霍乱弧菌。该菌株 MLST 型别为 ST1480,该型别与 ST182 最接近,仅 pyrC 不同(ST1480: pyrC38, ST182: pyrC75)。该等位基因核苷酸相差 48 个碱基(pyrC_38/pyrC_75),通过重组分析表明 pyrC 发生重组。进化树结果显示 HZ20-124 处在 L3b. 1 分支中,与 HZ11-1 和 HZ11-2 高度同源。比较 3 个 L3b. 1 基因组的基因分布,结果显示 HZ20-124 含有 L3b. 1 分支中特有的 133 个基因,主要分布在 49.6、34.9 和 8.6 k 这 3 个序列片段。将其进行 BLAST 比对,结果 8.6 k 序列与 2 株第七次霍乱大流行前的中东地区 CNTP 霍乱分离株(NCTC5395、NCTC9420)序列近源^[27]。另 2 个 contigs 未获得命中结果。其他特有基因 BLAST 比对后发现在数据库中携带的物种主要是其他种弧菌。推测由于食品分离株与环境的各类弧菌发生频繁的基因交换,这些基因功能可能与适应复杂的环境变化有关。

本研究鉴定 1 株 L3b. 1 分支的 CNTP 食品分离株,揭示了养殖或销售场所存在 CNTP 菌株,而环境中溶源性噬菌体 CTXΦ 可以水平转移^[28],一旦 CNTP 菌株适应养殖场所和水体环境而大量繁殖,会增加这类可移动元件水平转移的机会,存在导致霍乱疫情暴发的风险。

甲鱼养殖的外部环境如 pH 值、水温等较适宜霍乱弧菌增长^[29]。通过对甲鱼等爬行类动物开展弧菌监测,检出与杭州本地流行的 CNTP L3b. 1 进化分支临床菌株高度近源的食品分离株,提示临床散发病例的感染可能与该类食品污染有关。虽然 L3b. 1 并不是杭州 CNTP 主要分支,但对揭示临床散发 CNTP 菌株的感染来源提供了直接的食物来源证据,应对该类养殖场所及销售场所加强终末端消毒,提高环境卫生水平,保证人民身体健康。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部疾控司. 霍乱防治手册[Z]. 5 版, 1999.

Department of Disease Control, Ministry of Health of the People's Republic of China. Cholera control and prevention handbook [Z]. 5th edition, 1999.

- [2] SACK D A, SACK R B, NAIR G B, et al. Cholera [J]. The Lancet, 2004, 363(9404): 223-233.
- [3] KIM E J, LEE C H, NAIR G B, et al. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1 [J]. Trends in Microbiology, 2015, 23(8): 479-489.
- [4] 吕华坤, 陈恩富. 2000—2006 年浙江省霍乱流行特征分析 [J]. 中国农村卫生事业管理, 2008, 28(11): 853-855. LYU H K, CHEN E F. Analysis of Epidemiological Characteristics of Cholera in Zhejiang Province from 2000 to 2006 [J]. Chinese Rural Health Service Administration, 2008, 28(11): 853-855.
- [5] WANG H Q, YANG C, SUN Z, et al. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxigenic lineages [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2020, 14(2): e0008046.
- [6] 商晓春, 汪皓秋, 胡薇薇, 等. 杭州市首例外环境水体中检出稻叶型霍乱弧菌及病原学分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(7): 659-661. SHANG X C, WANG H Q, HU W W, et al. Etiological analysis on a *Vibrio cholerae* strain of Inaba serotype isolated firstly from environmental water in Hangzhou [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2008, 24(7): 659-661.
- [7] HALPERN M, IZHAKI I. Fish as hosts of *Vibrio cholerae* [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 282.
- [8] 汪皓秋, 孟冬梅, 于新芬, 等. 杭州市 O139 群霍乱弧菌耐药变迁及毒力基因携带 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(3): 321-322. WANG H Q, MENG D M, YU X F, et al. Variance of antibiotic resistance and virulence gene of *Vibrio cholerae* O139 in Hangzhou city [J]. Chinese Journal of Public Health, 2006, 22(3): 321-322.
- [9] KENNETH DURBROW. NCBI: sra-tools [Z/OL]. (2022-02-10) [2022-04-10]. <https://github.com/ncbi/sra-tools>.
- [10] HOUNMANOU Y, LEEKITCHAROENPHON P, HENDRIKSEN R S, et al. Surveillance and genomics of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from fish, phytoplankton and water in Lake Victoria, Tanzania [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 901.
- [11] SIRIPHAP A, LEEKITCHAROENPHON P, KAAS R S, et al. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169324.
- [12] ANDREWS S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data [Z/OL]. (2019-08-01) [2022-04-10]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- [13] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19(5): 455-477.
- [14] SEEMANN T. Shovill: Assemble bacterial isolate genomes from Illumina paired-end reads [Z/OL]. (2020-08-04) [2022-04-10]. <https://github.com/tseemann/shovill>.
- [15] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.

- [16] SEEMANN T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*: Oxford, England, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [17] SEEMANN T. Mlst: Scan contig files against PubMLST typing schemes [Z/OL]. (2021-10-21) [2022-04-10]. <https://github.com/tseemann/mlst>.
- [18] JOLLEY K A, MAIDEN M C J. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 595.
- [19] SEEMANN T. Abricate: Mass screening of contigs for antimicrobial and virulence genes [Z/OL]. (2020-05-12) [2022-04-10]. <https://github.com/tseemann/abricate>.
- [20] CHEN L H, ZHENG D D, LIU B, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 44(D1): D694-D697.
- [21] SEEMANN T. Snippy: Fast bacterial variant calling from NGS reads [Z/OL]. (2020-08-04) [2022-04-10]. <https://github.com/tseemann/snippy>.
- [22] CROUCHER N J, PAGE A J, CONNOR T R, et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 43(3): e15.
- [23] STAMATAKIS A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [24] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [25] PAGE A J, CUMMINS C A, HUNT M, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(22): 3691-3693.
- [26] CHEN H B, BOUTROS P C. Venn Diagram: A package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 35.
- [27] HU D L, LIU B, FENG L, et al. Origins of the current seventh cholera pandemic [J]. *PNAS*, 2016, 113(48): E7730-E7739.
- [28] LI X, ZHAO L, GAO H, et al. A novel pre-CTX prophage in the *Vibrio cholerae* serogroup O139 strain [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020, 81: 104238.
- [29] 王娟, 任永林. 春季甲鱼常见疾病及其防治(上) [J]. *科学养鱼*, 2009(4): 83.
- WANG J, REN Y L. Common diseases of soft-shelled turtles in spring and their control (Part 1) [J]. *Scientific Fish Farming*, 2009(4): 83.