

不同来源的霍乱弧菌毒力特征的质谱学分析

屠博文¹, 薛银刚², 姚萍¹, 王楠³, 黎俊宏¹, 唐宏兵¹, 杜强^{1,*}

(1.常州市疾病预防控制中心, 江苏常州 213022;

2.常州大学环境与安全工程学院, 江苏常州 213003;

3.泰州医药高新区市场监督管理局医疗器械处, 江苏泰州 225300)

摘要:目的:分析本地区食品风险监测样品中霍乱弧菌的分布,评价使用 VITEK-MS 微生物质谱进行霍乱弧菌快速鉴定的优劣。方法:从淡水产品和病人分离获得霍乱弧菌,分别进行 VITEK-2 生化鉴定和 VITEK-MS 质谱鉴定。血清凝集和胶体金显色法检测霍乱弧菌血清型,PCR 检测 *ctx* 毒力基因。通过全基因组测序分析霍乱弧菌毒力基因类型。结果:经快速鉴定检出 23 株霍乱弧菌,17 株为非 O1/O139 血清型,6 株为 O139 型并且携带 *ctx* 毒力基因。VITEK-MS 微生物质谱检出的霍乱弧菌具有典型的指纹图谱特征,O139 型霍乱弧菌具有典型的特有峰和缺失峰特征。全基因组测序显示 O139 血清型具 *ctxAB*、*ace* 和 *tcp* 毒力岛等毒力基因,而非 O1/O139 株则只具有辅助毒力因子,个别腹泻病例株携带了 *zot* 基因。结论:非 O1/O139 和 O139 型霍乱弧菌无论在毒力基因种类和质谱特征上都具有显著的差异,广泛应用 VITEK-MS 微生物快速鉴定技术进行霍乱弧菌血清鉴定有望成为霍乱监测的新助力。

关键词:霍乱弧菌,微生物质谱(VITEK-MS),全基因组测序,毒力基因,指纹图谱

Virulence Characteristics Application of *Vibrio cholera* from Different Source by Microbial Mass Spectrometry

TU Bowen¹, XUE Yingang², YAO Ping¹, WANG Nan³, LI Junhong¹, TANG Hongbing¹, DU Qiang^{1,*}

(1.Changzhou Center of Disease Prevention and Control, Changzhou 213022, China;

2.School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213003, China;

3.Medical device department of market supervision administration of
Taizhou pharmaceutical high-tech zone, Taizhou 225300, China)

Abstract: Objective: To analysis the regularities of distribution of *Vibrio cholera* from food risk monitoring samples and evaluate the merits of VITEK-MS rapid analysis methods in identification of *Vibrio cholera*. Methods: *V.cholera* strains were isolated from freshwater products and patients. The VITEK-MS and VITEK-2 identification were operated respectively. The serotype was detected by serum agglutination and immunogold. The virulence genes *ctxAB* was detected by qPCR. All the virulence genes in different types of strains were analyzed by whole genome sequencing. Results: 17 of the 23 *V.cholera* strains were non-O1/O139 serotype. 6 strains were detected as O139 *V.cholera* and *ctxAB* gene carrier. All the *V.cholera* strain showed typical mass spectral characteristics based on the fingerprint spectrum. The particular and lacking peaks patterns of O139 *V.cholera* were representative for Serotype identification. *ctxAB*, *ace* and *tcp* islands genes were harbored in O139 *Vibrio cholera*, but only auxiliary virulence factor can be detected in non-O1/O139 *Vibrio cholera* except *zot* gene. Conclusion: There are many differences between the O139 and non-O1/O139 *Vibrio cholera* strains in whether virulence gene type or fingerprint spectrum. The thorough application for serotype identification by using microbial mass spectrometry may be a new assistance for cholera surveillance.

Key words: *Vibrio cholera*; microbial mass spectrometry (VITEK-MS); whole genome sequencing; virulence genes; fingerprint spectrum

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)06-0130-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2020060092

引文格式:屠博文,薛银刚,姚萍,等.不同来源的霍乱弧菌毒力特征的质谱学分析[J].食品工业科技,2021,42(6):

收稿日期:2020-06-09

作者简介:屠博文(1984-),男,博士,副研究员,研究方向:微生物质谱鉴定研究,E-mail:tbwchangzhou@163.com。

*通信作者:杜强(1976-),男,本科,副检验技师,研究方向:微生物检测,E-mail:tbwchangzhoutbw@sina.com。

基金项目:江苏省卫生健康委科研课题面上项目(H2018098);常州市重大科技支撑计划(社会发展)(CE20185048和CE20175022);江苏省预防医学会课题(Y2018023);常州市应用基础研究计划(CJ20190071)。

130-136, 150.

TU Bowen, XUE Yingang, YAO Ping, et al. Virulence Characteristics Application of *Vibrio cholerae* from Different Source by Microbial Mass Spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 130-136, 150. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)是引起霍乱疫情的元凶。自1817年被发现以来,霍乱在全世界发生7次大流行,是世人瞩目的腹泻型烈性传染病^[1]。O1/O139霍乱弧菌是引起霍乱的血清型株^[2],非O1/O139霍乱弧菌也能引起非霍乱型腹泻,并广泛分布于我国的湖泊、河流和农田中^[3]。除导致肠胃炎等肠道感染外,非O1/O139菌株还能扩散至食品和饮用水中,引发食物中毒,但无法引致霍乱疫情,因此被忽视^[4]。随着全球变暖和气候变迁导致淡水水体表层水温升高,非O1/O139型弧菌感染案例的数量急剧升高^[5],而我国食品安全风险监测工作中尚未开展有关非O1/O139霍乱弧菌的专项监测工作。首先,从疾病的发病情况看,全球报道的由非O1/O139霍乱弧菌引致的感染病例仍然处于散发状态^[6-7],非O1/O139霍乱弧菌感染病例大都属于本地菌株,分布范围具有明显的区域性。分析食品中的霍乱弧菌分布,是食品风险监测工作的重要组成部分。水产品携带霍乱弧菌极易导致水体污染和扩散,一旦生食污染水和食品,极易造成霍乱流行或霍乱肠道感染事件的发生。另一方面,探讨不同来源的霍乱弧菌的感染机制需要了解其基因型与表型的差异。CTX毒素是霍乱弧菌的主要毒力,CTX噬菌体携带的ctxAB基因在特定条件下在霍乱弧菌种群中发生水平转移和扩散是霍乱疫情爆发的主要原因^[8],此类霍乱弧菌在自然环境下能够在淡水水体中长期存在^[9-10]。此外,毒素协同调节菌毛(toxin-coregulated pilus, TCP)^[11-12]和其他的毒力相关因子,如溶血素^[13]、造孔蛋白毒素RTX(repeats in the structural toxin peptide)^[14-15]也是霍乱弧菌的重要毒力因子。霍乱弧菌感染和毒性相关研究证实,携带不同的毒力基因和致病因子是霍乱弧菌毒性的评估指标。引起的食源性疾病的非O1/O139霍乱弧菌,其血清学和基因型等特征与水产品来源的菌株是否存在差异,在食品风险监测工作中长期被忽视。因此分析不同来源的霍乱弧菌其血清型和基因型差异,对比毒力因子的携带与致病相关性可能是研究霍乱弧菌引起的非霍乱腹泻及霍乱疫情发生发展关键起因的重要依据。

从检测技术上看,快速检测技术能够帮助食品风险监测工作更高效的完成检测任务,实现精准检测和快速监测的目标,而微生物质谱技术应用于微生物检测领域日益受到关注和重视。使用微生物质谱进行霍乱弧菌快速鉴定,能够在短时间内获得病原信息,为食源性疾病爆发调查和处置争取时间,意义重大。基质辅助激光解析时间飞行质谱(MALDI-TOF-MS)是一种新型微生物快速鉴定技术,近年来不断的应用于微生物鉴定,尤其是高危病原菌的快速检测^[16-18]。VITEK-MS就是应用该项技术(应用较

晚)的最新微生物质谱检测平台^[19]。微生物质谱技术在霍乱弧菌病原学水平中的深度和广度,有助于帮助一线检测机构及时把握霍乱病原的分布规律和流行特征,遏制霍乱的再次爆发。

本文通过VITEK-MS质谱等检测方法对食源性风险监测淡水水产品(螺类)所检出的非O1/O139群霍乱弧菌和病人来源的O139群株进行快速检测对比,一方面评价VITEK-MS微生物鉴定在应对突发公共卫生事件中的应用前景,另一方面从血清学、基因型、全基因组和质谱学多个角度探讨不同来源的O139和非O1/O139霍乱弧菌的表型、基因型及质谱特征,探讨运用微生物质谱平台分析霍乱弧菌的新方法,以便更好地应对气候变化引致的病原扩散和潜在的突发公共卫生事件。

1 材料与方法

1.1 菌株来源、主要试剂和仪器

相关菌株分离自食品风险监测采样淡水贝壳和螺类及突发公共卫生事件哨点医院病人肛拭子,选择鉴定为霍乱弧菌的菌落作为实验菌株,共计23株。以ATCC8739大肠杆菌为质量控制对照株,所有菌株均使用磁珠保存管保存于-80℃。

CHCA基质液 法国梅里埃公司;霍乱弧菌血清鉴定胶体金试纸 辽宁迪浩生物技术有限公司;霍乱弧菌血清型鉴定试剂盒 万泰生物技术有限公司;弧菌显色平板 美国科马嘉公司;TCBS显色平板 海博生物技术有限公司;霍乱弧菌ctxAB基因核酸检测试剂盒 硕世生物技术有限公司;QIAamp DNA Mini Kit Qiagen公司;2×EasyTaq PCR SuperMix 全式金生物技术有限公司。VITEK-MS微生物质谱鉴定系统、VITEK-2 compact全自动生化鉴定仪 法国梅里埃公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品采集和分离纯化 依照2018年食品风险监测工作要求文件《江苏省食源性疾病监测工作手册》的操作要求,对淡水水产品,主要是河蚌和螺蛳样品进行增菌,分离纯化和鉴定,将医院报告的公共卫生事件患者检出的霍乱菌株接种血琼脂平板37℃培养18 h进行复苏。

1.2.2 微生物鉴定和血清型分型 经过复苏选择单一菌落,分别进行VITEK-2生化鉴定和VITEK-MS微生物质谱鉴定。采用ctxAB霍乱毒力基因检测试剂盒及霍乱弧菌血清型鉴定试剂盒对霍乱株进行基因型和血清型分析。

1.2.3 VITEK-MS质谱分析 选取每一株霍乱弧菌的质谱图谱,获得荷质比(m/z)及相对峰强度数据,使用Origin 8.1绘制指纹图谱。对各峰进行统计分析,获得霍乱弧菌共性峰、独有峰的数据。每株菌检测100次,获得荷质比和峰强度平均值。

1.2.4 全基因组测序及毒力基因数据库比对分析 选择代表性菌株,采用 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen,USA)提取基因组 DNA 送交 Genewiz 公司进行全基因组测序,对结果进行包装和分析,进行毒力基因数据库比对以获得代表株毒力基因种类信息。

1.2.5 毒力基因 PCR 扩增验证 对霍乱株进行 *ctxAB*、*zot*、*rtxA*、*hlyA*、*ompU*、*hap*、*eta*、*toxRS*、*ace* 和 *tcp* 毒力因子的 PCR 扩增^[20-21],PCR 产物进行 Sanger 测序,检测并验证所携带毒力基因类型。

2 结果与分析

2.1 霍乱弧菌鉴定及血清型检测结果

经 VITEK-MS 和 VITEK-2 鉴定检出 23 株霍乱弧菌,其中非 O1/O139 霍乱弧菌 17 株,O139 病人菌株 6 株。霍乱阳性菌株分离于 2017 年霍乱突发公共卫生事件中病患肛拭 6 份,经免疫胶体金试纸和血清鉴定全部为 O139 型霍乱弧菌,PCR 扩增显示 *ctxAB* 毒力基因为阳性。2018 年食品风险监测样品共计 24 份淡水贝壳及螺样品,经胶体金和血清鉴定 8 株为非 O1/O139 型霍乱,阳性率为 33.3% (8/24),*ctxAB* 毒力基因 PCR 扩增为阴性。由两家医院报告

的霍乱腹泻感染报告病人的菌株经复核,9 株均为非 O1/O139 型,不携带 *ctxAB* 基因。医院报告的霍乱菌株,相关流行病学调查均未获得可疑食品,无法判断是否食用霍乱弧菌污染的食物导致感染。待测单菌落经 VITEK-MS 分析 10 min 立即获得菌株信息,而 VITEK-2 相关结果于次日早晨获得,可见 VITEK-MS 微生物质谱分析方法在霍乱事件应急检测中具有快速高效的特点。

2.2 质谱指纹图谱特征分析

23 株霍乱弧菌的质谱指纹图谱,其中 S1、S2 和 S3 为 SARRMIS 数据库霍乱弧菌超级图谱指纹图谱(图 1 及图 2)。不同血清型的霍乱弧菌具有 18 个共同特征峰 m/z 2139、2149、2561、3082、3226、3579、4178、4279、4300、4690、5083、5123、5283、6167、6277、6454、7160 和 8358 (表 1),此外各株特征峰有缺失(表 1)。O139 株与大部分霍乱弧菌相比存在更大的差异,具有特征性的独有峰 (m/z 2076、2275、2690、2826、2985、3550、3779、4226、5318、5540、5635、5780、6654、6905、7221、8020 和 19920),具有独特的缺失峰 (m/z 3558)。此外,霍乱腹泻病人检出的非 O1/O139 株具有特有峰 (m/z 2379、8092、9124),而河蚌和螺

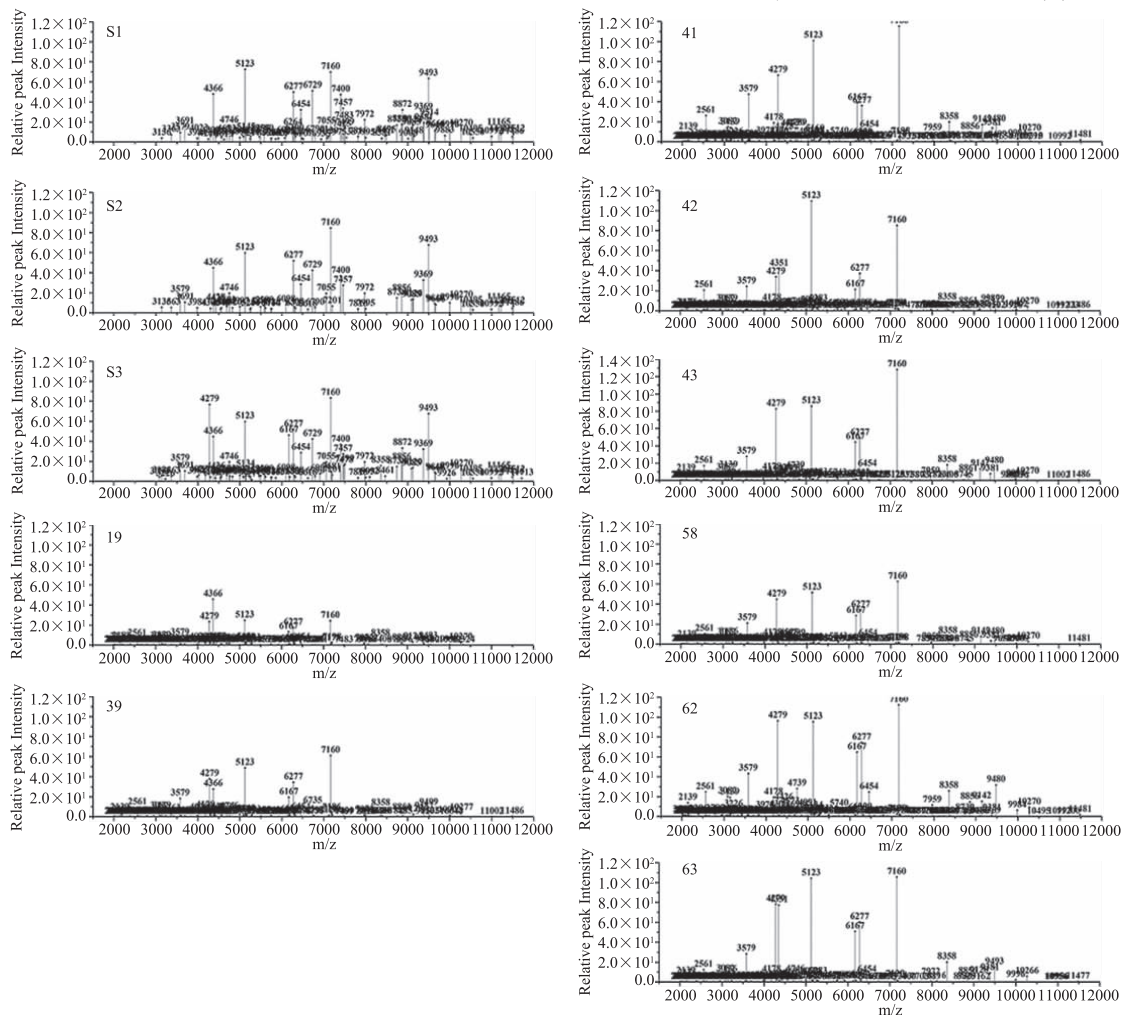


图1 霍乱弧菌 SARRMIS 数据库超级图谱及环境检出株指纹图谱

Fig.1 *Vibrio cholerae* fingerprint spectrum of SARRMIS database and environmental strains

注:S1~S3:霍乱弧菌标准图谱;19~63:螺类等携带的非 O1/O139 霍乱弧菌。

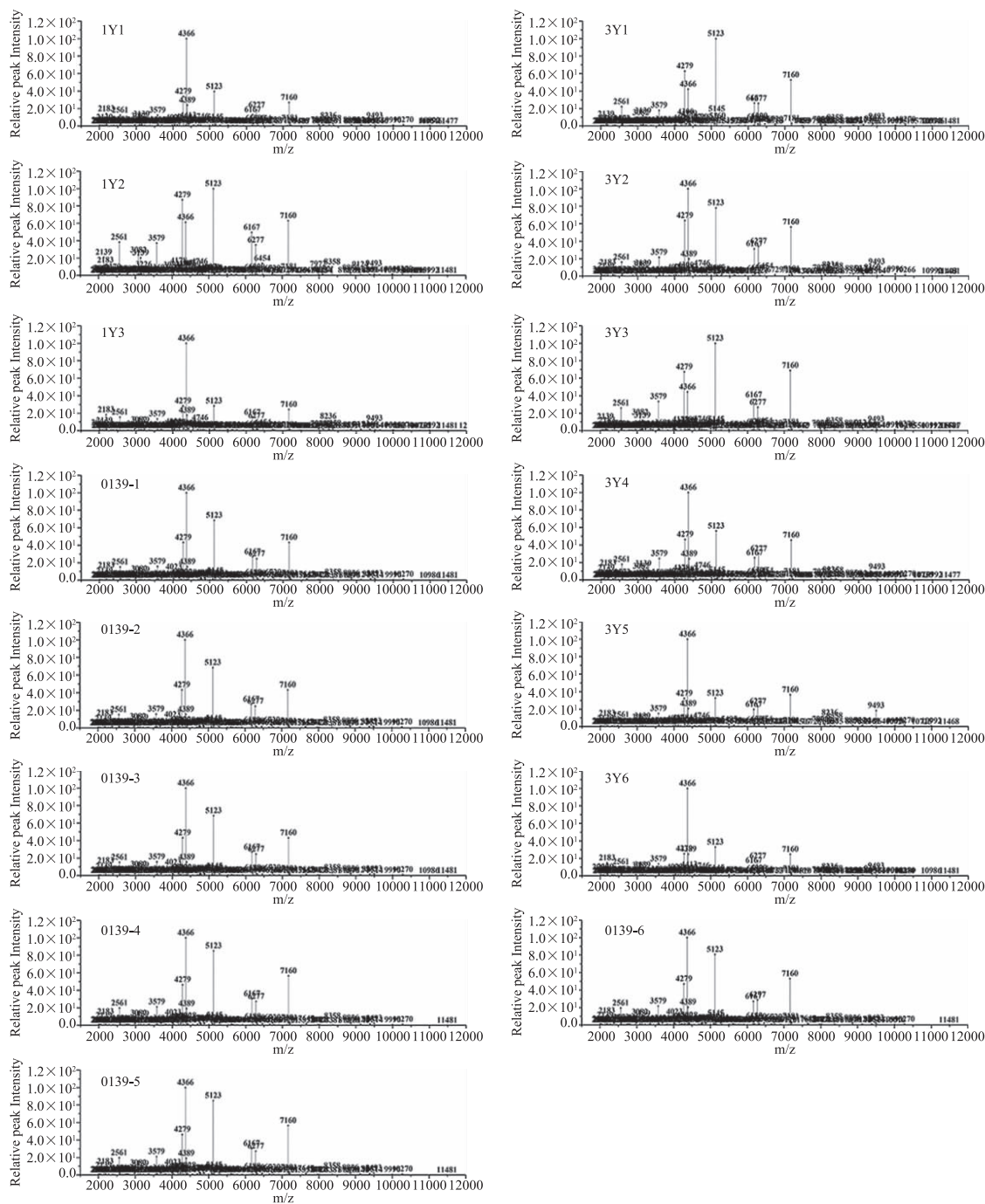


图2 霍乱弧菌医院病人检出 O139 及非 O1/O139 株指纹图谱
Fig.2 *Vibrio cholerae* fingerprint spectrum of the O139 and non O1/O139 strains from hospital patients
注:1Y1~3:A 医院病人非 O1/O139 株;3Y1~6:B 医院病人非 O1/O139 株;o139-1~6;O139 霍乱病人。

表1 不同来源检出的 O139 及非 O1/O139 型霍乱弧菌特征峰分布

Table 1 Characteristic peak distribution non O1/O139 strains from different sources

类别	荷质比(m/z)
霍乱株共有峰	2139,2149,2561,3082,3226,3579,4178,4279,4300,4690,5083,5123,5283,6167,6277,6454,7160,8358
O139 株独有峰	2076,2275,2690,2826,2985,3550,3779,4226,5318,5540,5635,5780,6654,6905,7221,8020,19920
O139 株缺失峰	3558
环境株独有峰	2386
病例组独有峰	2379,8092,9124

类来源环境检出的非 O1/O139 株也具有特有峰 (m/z 2386)。根据指纹图谱数据绘制的热图(图3)可见 O139 群的指纹图谱与其他类型的霍乱弧菌具

有较大差异,O139 群特有峰和缺失峰组成的指纹图谱特征可以作为微生物质谱分析 O139 型霍乱弧菌的生物标志物。

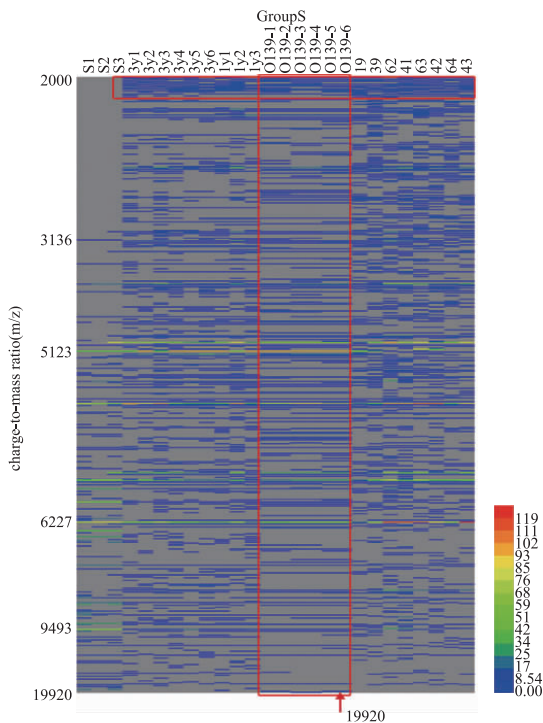


图3 霍乱弧菌各血清型菌株质谱数据热图

Fig.3 Heat map for mass spectrum data of different serotypes *Vibrio cholera*

注:图例所示为相对峰强度从蓝色至红色逐渐升高,横坐标为各血清型菌株编号,纵坐标为 m/z 值 2000~20000 Da,从上至下由低到高依次排列。

2.3 霍乱弧菌全基因组测序结果及毒力基因分布

每种血清型各随机挑取 2 株,选择 41、62、1Y1、3Y1、O139-1 和 O139-3 号菌株进行全基因组测序。采用 Illumina HiSeq 测序平台,以霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae* 48853_H01, LT992488.1) 为参考基因组进行

重测序,平均测序深度 750,基因组数据使用 Nr 注释,并使用 KEGG、COG、GO、TCDB、VFDB 数据库进行基因功能、转运蛋白和毒力因子分析,每株获得 2000~2200 万条 reads,获得基因组长度在 274~510 kbp 之间。经毒力基因测序和数据库比对,检出毒力基因有 *ctxA*、*ctxB*、*zot*、*rtxA*、*hlyA*、*ompU*、*hap*、*eta*、*toxR*、*toxS*、*ace* 和 *Tcp* 毒力岛。O139 群均携带了所有的毒力基因,尤其是 *ctxAB*、*ace* 和 *tcp* 毒力岛具有多个拷贝。环境来源与霍乱腹泻病人非 O1/O139 株均携带了 *rtxA*、*hlyA*、*ompU*、*eta* 和 *toxRS* 毒力基因,缺失 *ctxAB*、*ace* 和 *tcp* 毒力岛,其中非 O1/O139 霍乱腹泻的菌株携带了 *zot* 基因,缺失 *hap* 基因。PCR 检测证实全基因组测序结果是可靠的,除环境株个别毒力基因有差异外,霍乱腹泻病人和霍乱病人来源的菌株均携带相同的毒力基因类型,各类血清型菌株详细信息及所携带毒力基因见表 2。毒力基因功能注释选择使用 VFDB (Virulence Factors of Pathogenic Bacteria) 数据库进行预测,基因名称和功能预测见表 3。此外,经过前噬菌体分析,编号 1Y1 及 3Y1 霍乱弧菌分别携带了 VCY-phi (NC_016162.1) 和 KSF1-phi (NC_006294) 前噬菌体,而 41 及 62 霍乱株携带的是 X29 (NC_024369.2) 和 12A4 (NC_021068) 噬菌体片段, O139-1/3 株未检测到完整的噬菌体数据(见表 2)。

3 讨论

首先,O1/O139 群霍乱弧菌能够引起霍乱流行,是研究霍乱最重要的病原体。除了高致病性的 O1/O139 血清型外,霍乱弧菌还拥有超过 200 种非 O1/O139 血清型株,并广泛分布于全球^[22-23]。霍乱弧菌的毒力因子较多,其中 *ctxAB*、*toxR*、*zot*、*ace*、*tcp* 毒力岛等都属于重要的霍乱毒力基因^[20-21],而其他毒素相关辅助因子也参与了霍乱弧菌产毒过程^[24]。本文

表 2 霍乱弧菌基因组测序检出毒力基因类型

Table 2 Virulence genotype of the *Vibrio cholera* by gene sequencing

样本	菌株来源	血清型	特征峰 (m/z)	<i>ctxAB</i>	<i>zot</i>	<i>rtxA</i>	<i>hlyA</i>	<i>ompU</i>	<i>hap</i>	<i>eta</i>	<i>toxRS</i>	<i>ace</i>	<i>tcp</i>
19	铜锈环棱螺	非 O1/O139	2386			■	■	■	■	■	■		
39	田螺	非 O1/O139	2386			■	■	■	■	■	■		
41	田螺	非 O1/O139	2386			■	■	■	■	■	■		
42	田螺	非 O1/O139	2386			■	■	■	■	■	■		
43	河蚌	非 O1/O139	2386			■	■	■		■	■		
58	铜锈环棱螺	非 O1/O139	2386			■	■	■	■	■	■		
62	溧阳螺蛳	非 O1/O139	2386			■	■	■	■	■	■		
63	香螺	非 O1/O139	2386			■	■	■	■		■		
1Y1	A 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
1Y2	A 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
1Y3	A 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
3Y1	B 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
3Y2	B 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
3Y3	B 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
3Y4	B 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
3Y5	B 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
3Y6	B 医院腹泻病人	非 O1/O139	2379、8092、9124		■	■	■	■		■	■		
O139-1	霍乱病人	O139	见表 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
O139-2	霍乱病人	O139	见表 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
O139-3	霍乱病人	O139	见表 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
O139-4	霍乱病人	O139	见表 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
O139-5	霍乱病人	O139	见表 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
O139-6	霍乱病人	O139	见表 1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

表3 预测数据库毒力基因功能注释

Table 3 Functional annotation of virulence gene from prediction database

基因描述	功能注释
Cholera enterotoxin subunit A	霍乱毒素亚基 A
Cholera enterotoxin subunit B	霍乱毒素亚基 B
zona occludens toxin	紧密连接毒素
RTX toxin RtxA	霍乱弧菌感染相关
hemolysin	溶血素
outer membrane protein OmpU	帮助霍乱弧菌形成生物被膜,感染相关
vibriolysin	帮助霍乱弧菌形成生物被膜,感染相关
exfoliative toxin A/B	表皮脱落毒素
cholera toxin transcriptional activator	霍乱毒素转录激活因子
transmembrane regulatory protein ToxS	霍乱毒素跨膜转运蛋白
accessory cholera enterotoxin	霍乱肠毒素
toxin co-regulated pilus biosynthesis protein	毒素菌毛共调蛋白

涉及的霍乱腹泻来源菌株,由于流行病调查未获得可疑食物来源,分子溯源也未观察到两者关联性,无法分析食源性疾病的致病来源。本研究发现,环境与腹泻病例来源的非 O1/O139 霍乱弧菌具有相似的毒力基因特征,可推测环境中河蚌及螺类所携带的非 O1/O139 株有能力引发霍乱腹泻病。值得注意的是,霍乱病例菌株携带了 *zot* 毒力基因,而长期以来 *zot* 基因被认为是霍乱致病的辅助毒素。*zot* 基因编码了紧密连接毒素,可以直接作用于小肠上皮细胞紧密连接,使得破坏紧密连接蛋白结构并导致肠出血^[25]。非 O1/O139 株霍乱弧菌检出携带 *zot* 基因,该发现在霍乱型腹泻患者病例报告中未见报道。在一旦病人具有基础疾病,如肝炎等,非 O1/O139 株霍乱弧菌感染可进一步导致菌血症^[26]。因此,非 O1/O139 型霍乱弧菌,尤其是携带了 *zot* 基因霍乱株,其感染和产毒能力需要更多的研究进行评估。

全基因组测序发现,很多霍乱菌株携带了噬菌体或前噬菌体。通常引起霍乱的霍乱弧菌携带了一种 CTXphi 噬菌体,而携带 *zot* 基因而缺失 *ctxAB* 基因的霍乱弧菌则携带的是 pre-CTXphi 噬菌体。据报道,非 O1/O139 霍乱弧菌引发的霍乱腹泻发病率较低,但通常病情比较凶险,非 O1/O139 霍乱弧菌的 VCY-phi 和 KSF1-phi 前噬菌体序列共享了大部分 CTXΦ 噬菌体的序列片段^[27-28]。当 CTXΦ 噬菌体丢失了 CTX 毒力岛后,往往会转化为其他类型的噬菌体或前噬菌体,如 VCY-phi 和 KSF-1 phi,VCY-phi 前噬菌体在霍乱弧菌种群中的分布频率较高^[29]。CTXΦ 噬菌体缺失了 CTX 毒力岛后,有可能形成前噬菌体 KSF-1 phi,并能够通过增强某些毒力基因转移元件(如 RS1 卫星序列)促进种群中 CTXΦ 噬菌体的扩散^[30]。可见,监测非 O1/O139 霍乱弧菌的噬菌体类型,能够帮助监测工作识别噬菌体类型特征明显的致病株,并提出预警以预防可能发生的霍乱腹泻病。

另一方面,携带不同毒力基因的霍乱弧菌其致病特征有明显差异。本实验证实质谱技术能对霍乱弧菌进行快速分型,此技术可以成为霍乱疫情监测工作的助力。质谱数据获得的指纹图谱可以直观的表明,不同血清型的霍乱弧菌之间的差异具有典型

特征。各指纹数据都能够代表特定的保守蛋白,如 50S 核糖体蛋白 L36 特征峰为 *m/z* 5123,50S 核糖体蛋白 L32 为 *m/z* 6168,核糖体蛋白 L30 为 *m/z* 6455^[21]。本实验病人来源的霍乱弧菌均具有文献报道的 DNA 结合蛋白 HU-a 特征峰 *m/z* 9493,但是环境来源株缺失。据报道,O139 型霍乱弧菌在高质量区域具有显著的毒力峰^[31],本实验发现 O139 血清型株在 *m/z* 19920~19925 具有特有峰,在 *m/z* 35000 区域未发现质谱信号。该特征与 Armand Pauw 报道的毒力峰 *m/z* 34750 及 *m/z* 34690 有显著差异^[32]。有学者发现在 *m/z* 3202 处的特征峰是 CTX 毒素的另一种表现,敲除 *ctx* 毒力基因后该峰消失^[32]。本实验在 *m/z* 3200 附近未发现具有 O139 特征的质谱信号。深入分析不同血清型和疾病来源的霍乱弧菌的质谱特征,能够丰富质谱学快速检测霍乱弧菌的指纹谱数据。由于质谱技术应用较晚,对霍乱弧菌进行快速质谱分析和应用任重道远。

此外,某些特征峰可以作为区分霍乱弧菌与其他弧菌类型的标志物。如 *m/z* 4279 是所有弧菌属的特征峰,*m/z* 5123、6166、8739 和 8854 是霍乱弧菌特有,*m/z* 6168 存在于副溶血、创伤、溶藻、哈维和坎贝拉弧菌中,而 *m/z* 6277 在霍乱和费氏弧菌中存在^[33]。本实验中发现大部分的霍乱弧菌株缺失了 *m/z* 8739 和 8854 峰。由此可见,利用质谱特征峰作为生物标志物进行物种甚至血清学判别,不能仅仅依靠单一或若干特征峰,系统的分析不同来源的霍乱血清型菌株有助于优化和更新霍乱弧菌微生物质谱数据库。本文检出的多个可疑的 O139 霍乱弧菌特有峰、缺失峰以及其他质谱数据仍然需要大量验证和甄别。深入探讨霍乱弧菌微生物质谱技术中指纹图谱数据,建立稳定的 O1/O139 株质谱数据库,有望将微生物质谱技术扩展至血清型鉴定方面,使用质谱的技术分析霍乱弧菌信息,高效而快速,是未来食源性疾病和传染病病原快速检测的明星技术。

参考文献

[1] Ali M, Nelson A R, Lopez A L, et al. Updated Global burden of cholera in endemic countries [J]. PLoS Neglected Tropical

- Diseases, 2015, 9 (6) : e0003832. DOI: 10.1371/journal. pntd. 0003832.
- [2] Ramamurthy T, Das B, Chakraborty S, et al. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139 [J]. Vaccine, 2020, 38 : A73–A82.
- [3] Faruque S M, Chowdhury N, Kamruzzaman M, et al. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholera* population in a cholera–endemic area [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (7) : 2123–8.
- [4] Gong L, Yu P, Zheng H J, et al. Comparative genomics for non – O1/O139 *Vibrio cholerae* isolates recovered from the Yangtze River Estuary versus *V. cholerae* representative isolates from serogroup O1 [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2019, 294 (2) : 417–430.
- [5] Fu S Z, Hao J W, Jin S B, et al. A Human intestinal infection caused by a novel non–O1/O139 *Vibrio cholerae* genotype and its dissemination along the river [J]. Frontiers in Public Health, 2019, 7 : 100.
- [6] Baker–Austin C, Trinanès J A, Taylor N G H, et al. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming [J]. Nature Climate Change, 2012, 3 (1) : 73–77.
- [7] Frank C, Littman M, Alpers K, et al. *Vibrio vulnificus* wound infections after contact with the Baltic Sea, Germany [J]. Euro Surveillance, 2006, 11 (8) : E060817.1.
- [8] Kim E J, Yu H J, Lee J H, et al. Replication of *Vibrio cholerae* classical CTX phage [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114 (9) : 2343–2348.
- [9] 夏晓滨. 霍乱弧菌生物被膜 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28 (4) : 381–384.
- [10] Huq A, Whitehouse C A, Grim C J, et al. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19 (3) : 244–247.
- [11] Chang Y W, Kjær A, Ortega D R, et al. Architecture of the *Vibrio cholerae* toxin – coregulated *Pilus* machine revealed by electron cryotomography [J]. Nature Microbiology, 2017, 2 : 16269.
- [12] Ng D, Harn T, Altindal T, et al. The *Vibrio cholerae* minor pilin TcpB initiates assembly and retraction of the toxin – coregulated *Pilus* [J]. PLoS Pathogens, 2016, 12 (12) : e1006109.
- [13] Rahman M H, Biswas K, Hossain M A, et al. Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area: Tracking the evolution of pathogenic strains [J]. DNA and Cell Biology, 2008, 27 (7) : 347–355.
- [14] Chow K H, Ng T K, Yuen K Y, et al. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39 (7) : 2594–2597.
- [15] Satchell K J F. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats – in – toxin toxins [J]. Infection and Immunity, 2007, 75 (11) : 5079–5084.
- [16] Erler R, Wichels A, Heinemeyer E A, et al. *Vibrio* base: A MALDI–TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38 (1) : 16–25.
- [17] Vidal L M R, Venas T M, Gonçalves A R P, et al. Rapid screening of marine bacterial symbionts using MALDI–TOF MS [J]. Archives of Microbiology, 2020, 202 (8) : 2329–2336.
- [18] Kazazić S P, Topić Popović N, Strunjak–Perović I, et al. Matrix – assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry identification of *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* isolated from sea bass and sea bream [J]. PLoS One, 2019, 14 (11) : e0225343.
- [19] Krishnamurthy T, Ross P L, Rajamani U. Detection of pathogenic and non–pathogenic bacteria by matrix–assisted laser desorption/ionization time–of–flight mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM, 1996, 10 (8) : 883–888.
- [20] Bauer A, Rørvik L M. A novel multiplex PCR for the identification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45 (4) : 371–375.
- [21] Schirmeister F, Dieckmann R, Bechlers S, et al. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non–O1, non–O139 isolated from German and Austrian patients [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2014, 33 (5) : 767–778.
- [22] 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]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47 (4) : 1087–1095.
- [23] Pang B, Yan M Y, Cui Z G, et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array–based comparative genomic hybridization [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189 (13) : 4837–4849.
- [24] Bhattacharya T, Chatterjee S, Maiti D, et al. Molecular analysis of the rstR and orfU genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non – O1, non – O139 strains [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8 (3) : 526–634.
- [25] Mauritzen J J, Castillo D, Tan D M, et al. Beyond cholera: Characterization of zot–encoding filamentous phages in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* [J]. Viruses, 2020, 12 (7) : 730.
- [26] Shanley J, Kanj A, El Zein S, et al. Non – O1, non – O139 *Vibrio cholerae* bacteremia in an urban academic medical center in the United States [J]. IDCases, 2019, 15 : e00527.
- [27] Takemura T, Murase K, Maruyama F, et al. Genetic diversity of environmental *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Northern Vietnam [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 54 : 146–151.
- [28] Xue H, Xu Y, Boucher Y, et al. High frequency of a novel filamentous phage, VCY ϕ , within an environmental *Vibrio cholerae* population [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78 (1) : 28–33.
- [29] Faruque S M, Bin Naser, Fujihara K, et al. Genomic sequence and receptor for the *Vibrio cholerae* phage KSF – 1phi: (下转第 150 页)

的改善并不明显,这在一定程度上会限制产品的消费及应用,有待对百合粉冲调性等物性改善技术开展进一步的研究。

参考文献

- [1] 靳磊,张瑞军,雅蓉,等.岷江百合与兰州百合鳞茎中多酚组分及其生物活性[J].食品工业科技,2018,39(10):22-27,34.
- [2] Wang Y.Extraction technology and anti-depression activity of Saponins from *Lilium brownii* [J].Medicinal Plant,2014,5(6):46-48.
- [3] Hou R R, Chen J, Yue C J, et al. Modification of lily polysaccharide by selenylation and the immune - enhancing activity[J].Carbohydrate Polymers,2016,142:73-81.
- [4] He Chunlian, Li Gucai, Ren Fenglian, et al. Supercritical fluid extraction-high performance liquid chromatography determination of colchicine in lily [J].天然产物研究与开发,2003,15(1):5-8.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典-四部:2015年版分辑号:四部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [6] 赵健,赵志国,唐凤鸾,等.龙牙百合的研究进展[J].贵州农业科学,2017,45(7):78-81.
- [7] 贺建新.宝庆龙牙百合高产栽培技术[J].农民科技培训,2013(12):40-42.
- [8] 薛丽萍,徐学明.百合片护色工艺的研究[J].济宁学院学报,2015,36(6):16-21.
- [9] Zhang Z Y, Niu L Y, Li D J, et al. Low intensity ultrasound as a pretreatment to drying of daylilies: Impact on enzyme inactivation, color changes and nutrition quality parameters [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 36: 50-58.
- [10] 吕珍珍,陈曙,唐正平,等.不同加工方法对百合药材质量的影响[J].湖南中医杂志,2020,36(3):153-157.
- [11] 李彦丽.热烫及干燥方式对百合微观结构及理化特性的影响[D].长沙:湖南大学,2018.
- [12] 聂慧,严辉,钱大玮,等.加工方法对百合质量的影响研究[J].中国现代中药,2013,15(4):308-313.
- [13] 黄佩佩.五谷杂粮营养粉食品的研究[D].成都:西华大学,2013.
- [14] 张占军,王富花,葛洪,等.响应面法优化百合多糖超声辅助提取工艺[J].食品研究与开发,2017,38(18):40-44.
- [15] 金华,姜萌,刘治刚,等.百合多糖提取工艺的优化及抑菌活性研究[J].食品科技,2015,40(12):167-169.
- [16] 刘云鹤,王晓林,钟方丽.三氯化铝显色法测定刺玫叶提取物总黄酮的含量[J].特产研究,2017,39(2):50-53.
- [17] 薛梅,周卫平.龙牙百合鳞茎总黄酮提取工艺及抗氧化性研究[J].安徽农业科学,2017,45(3):10-12,30.
- [18] 靳磊,刘师源,吴婷,等.百合鳞茎中多酚类物质提取工艺的研究[J].食品工业,2015,36(12):167-171.
- [19] 张芳铭,滕海辉,金永学,等.红糖总多酚的提取测定及体外抗氧化作用[J].食品与发酵工业,2020,46(11):231-237.
- [20] 杜萌,刘璇,丁安伟,等.酸性染料比色法测定百合中总生物碱的含量[J].江苏中医药,2012,44(1):62-63.
- [21] 陈安徽,巫永华,刘恩岐,等.山楂叶多酚的酶法提取及抗氧化活性研究[J].食品科技,2017,42(2):203-208.
- [22] 吴峰华,刘相真,杨虎清,等.覆盆子醇提物及其不同极性部位抗氧化活性研究[J].中国食品学报,2012,12(2):24-29.
- [23] Brahmi F, Mechri B, Dabbou S, et al. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations [J]. Industrial Crops and Products, 2012, 38: 146-152.
- [24] 胡翔,李洛欣,罗堃,等.两种淀粉类辅料对真空微波干燥蓝莓多酚含量及抗氧化能力的影响[J].食品与发酵工业,2020,46(16):183-189.
- [25] Xiong F, Li X, Zheng L H, et al. Characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Passiflora edulis* Sims peel under different degradation methods [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 218: 46-52.
- [26] Chen Z G, Zhang D N, Zhu Q, et al. Purification, preliminary characterization and *in vitro* immunomodulatory activity of tiger lily polysaccharide [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 106: 217-222.
- [27] 赵芷萌,赵宏,王宇亮,等.百合多糖的纯化及其对肠道菌群失调小鼠的调节作用[J].食品工业科技,2020,41(8):295-300,306.
- [28] 肖遐,吴雄,何纯莲.百合多糖对 I 型糖尿病大鼠的降血糖作用[J].食品科学,2014,35(1):209-213.
- [29] 孙俊,张科卫,秦昆明,等.不同产地百合多糖的含量测定[J].南京中医药大学学报,2010,26(1):65-66.
- [30] 李化强,吴菲菲,龙艳珍,等.隆回龙牙百合多糖的体外抗氧化活性研究[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3068-3073.
- [31] 李利华.百合多糖的含量测定及抗氧化活性研究[J].湖北农业科学,2011,50(14):2954-2957.
- [32] 袁志鹰,罗林明,陈乃宏,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析百合珠芽化学成分及其薯蓣皂苷元抗肿瘤活性研究[J].天然产物研究与开发,2019,31(5):808-813,831.
- [33] 李忠海,钟海雁,常银子,等.百合膳食纤维降血糖作用的研究[J].食品与机械,2005,21(5):15-16.

(上接第 136 页)

Evolutionary divergence among filamentous *vibriophages* mediating lateral gene transfer [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(12): 4095-4103.

[30] Faruque S M, Kamruzzaman M, Asadulghani, et al. CTXphi-independent production of the RS1 satellite phage by *Vibrio cholerae* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 1280-5.

[31] Paauw A, Trip H, Niemcewicz M, et al. OmpU as a biomarker for rapid discrimination between toxigenic and epidemic *Vibrio cholerae* O1/O139 and non - epidemic *Vibrio cholerae* in a

modified MALDI - TOF MS assay [J]. BMC Microbiol, 2014, 14:158.

[32] Chaika S O, Telesmanich N R, Lomov Y M. Mass spectrometry virulence marker *Vibrio cholerae* [J]. Klinicheskaiia Laboratornaia Diagnostika, 2018, 63(7): 445-449.

[33] Dieckmann R, Strauch E, Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(1): 199-211.