

# 非 O1 群霍乱弧菌血清学分型系统的建立及初步应用

陈天寿 田万红 姜方武 袁佩娜

(中国药品生物制品检定所,北京)

莫美仪

(广东省卫生防疫站,广州)

陈拱立

(福建省卫生防疫站,福州)

周用直

(河南省卫生防疫站,郑州)

本文报道了非 O1 群霍乱弧菌血清学分型系统的建立。应用这一分型系统对我国广东、福建及河南三省分离的 549 株菌进行血清学定型。菌株可分为 55 型。其中的优势型为 VBO 2、7 及 9。菌型的分布与分离地区有关。并发现有 19 个菌型是日本及美国分型系统所未包括的新菌型。血清的分型率为 83.79%。对患者分离的菌株有较高的分型率。

**关键词** 非 O1 群霍乱弧菌;血清学分型系统

非 O1 群霍乱弧菌(以下简称非 O1 弧菌)过去被称为 Heiberg I 或 II 群 NAG 弧菌<sup>[1]</sup>。1972 年国际弧菌命名小组将它与 O1 群霍乱弧菌(以下简称 O1 弧菌)归为同一种,统称为霍乱弧菌<sup>[2]</sup>。这两群菌表型(phenotype)相似,用生化反应及 DNA 的 G+C 值对比检查难以区分,用抗体抗原(O)血清做特异性凝集试验是有效的鉴别手段。O1 群弧菌分为三个血清型,它们有共同的抗原因子 A,易于作出判断。非 O1 群弧菌血清型别多,没有共同的群抗原因子,因此需要有一个血清学分型系统,才能作出判断。

近二十多年,我国在对腹泻病病原菌的监测工作中,发现非 O1 群弧菌菌株大量存在,由于缺少血清学诊断,影响了病原学的深入研究。本文报道非 O1 群弧菌血清学分型系统的建立和初步应用的结果。

## 材料与方 法

### (一) 菌株

包括本实验室保存的国内分离的菌株和日本及美国用于制造分型血清的部分菌株(表 1)。全部菌株均按 Hugh, Sakazaki<sup>[3]</sup> 和 Farmer III<sup>[4]</sup> 提出的要求检查生物学特性。

### (二) 免疫血清制备

用 100℃ 2h 加热菌液制成 O 抗原,静脉免疫家兔,收获的免疫血清除测定对本菌的凝集价外,还与参加制备血清的全部菌株做玻片凝集试验,决定是否需要经过吸收以除去有交叉反应的非特异性凝集素。

### (三) 免疫血清的 R 抗体测定

用粗糙型霍乱弧菌 CA 385 与免疫血清分别做试管或玻片凝集,有凝集反应的免疫血清进行吸收。

本文于 1987 年 7 月 30 日收到。

参加此项工作的还有周国安、陈贻珠等同志。

表 1 菌株的类别、数量及来源

Table 1 The category, amount and source of strains

菌株 Strain	数量 Amount	来源 Source
实验室保存 Lab. stock	273	国内分离 Isolated in China
日本菌株 Sakazaki, Japan	82	日本国立卫生研究所 NIH, Japan
美国菌株 Smith, USA	12*	美国疾病控制中心 CDC, USA
粗糙型霍乱菌 <i>V. cholerae</i> , Rough	1	日本国立卫生研究所 NIH, Japan

\* 美国 smith 系统的部分菌株  
A part of strains in smith serotyping system

#### (四) 免疫血清的分群与型别编号

为方便使用,每 5 个分型血清混合编为一群,编号为 M1、M2、M3……。单一分型血清编号为 VBO2、VBO3、VBO4……。无 VBO1 编号,避免与 O1 群菌相混淆。

#### (五) 菌株定型

先用群血清(M)确定菌株属于哪一群,再用群内各型血清确定型别。

## 结 果

#### (一) 血清学分型系统的建立

从 367 株菌中筛选出 81 株菌制成分型血清,由于菌株的免疫原性有差别,血清效价多数在 1280 倍以上,少数为 320—640 倍(表 2)。

在 81 个分型血清中有 45 型存在着非特异性凝集反应,需要做吸收处理。经过 1—4 次吸收可除掉交叉凝集反应,半数以上的血清在吸收后仍可保持原有的凝集价水平。也有少数血清效价下降较多,但型特异性很好(表 3)。

用 CA 385 菌测定血清中的 R 抗体,均为阴性,不需要吸收处理。

血清按上述顺序分为 17 群(表 4)。

全部 81 型血清组成的血清学分型系

表 2 未经吸收的血清凝集效价

Table 2 The agglutinating titer of unabsorbed serum

血清号 (VBO) Serum no.	效价 Titer	血清号 (VBO) Serum no.	效价 Titer
2	2560	45	2560
3	1280	46	5120
4	2560	47	2560
5	5120	48	5120
6	1280	49	2560
7	5120	50	2560
8	1280	51	1280
9	2560	52	1280
10	5120	53	2560
11	1280	54	640
12	2560	55	2560
13	5120	56	2560
14	10240	58	1280
15	5120	59	2560
16	5120	60	2560
17	5120	61	1280
18	2560	62	2560
19	1280	63	2560
20	2560	64	5120
21	2560	65	1280
22	5120	66	1280
24	2560	68	2560
25	2560	69	2560
26	5120	70	2560
27	2560	71	1280
28	2560	72	2560
29	5120	74	2560
30	2560	75	2560
31	320	76	2560
32	5120	77	2560
33	2560	78	5120
34	2560	79	2560
35	5120	80	2560
36	1280	81	5120
38	2560	82	2560
39	2560	83	2560
40	1280	84	320
41	320	85	640
42	640	86	2560
43	1280	87	2560
44	3560		

统,简称为 VBO 分型系统。

表 3 血清吸收后的凝集效价

Table 3 The agglutinating titer of absorbed serum

血清号 (VBO) Serum no.	吸收菌 (VBO) Absorbed with strain	效价 Titer
4	29, 48	160
6	29	160
7	2, 64	2560
8	29	2560
10	9, 72	640
14	19, 20	2560
15	29, 81	2560
19	86	1280
20	29, 86, 14	2560
24	45	2560
28	72, 76	1280
29	6	1280
30	29	2560
31	21	320
32	12, 41, 56	1280
33	12, 28, 40	2560
35	38	640
38	22, 35	2560
39	22	2560
40	68, 33	640
41	29, 12	640
43	51, 49	640
44	59	2560
45	24	2560
47	48, 69	2560
48	4	1280
49	43	160
50	24	2560
51	43	1280
53	22	2560
59	72	2560
60	78	160
62	22	2560
65	16, 51, 69	1280
66	24	160
71	7, 63, 68, 69, 72	2560
72	10, 28	320
78	56	1280
80	69, 71, 72	5120
81	15	320
82	69	2560
83	22, 29	2560
85	4, 24	1280
86	20, 29, 19	1280
87	43, 53	1280

表 4 血清的分群\*

Table 4 The group of serum(M)\*

血清群 (M) Serogroup	血清型 (VBO) Serotype
1	2, 3, 4, 5, 6
2	7, 8, 9, 10, 11
3	12, 13, 14, 15, 16
4	17, 18, 19, 20, 21
5	22, 24, 25, 26
6	27, 28, 29, 30, 31
7	32, 33, 34, 35, 36
8	38, 39, 40, 41
9	42, 43, 44, 45, 46
10	47, 48, 49, 50, 51
11	52, 53, 54, 55, 56
12	58, 59, 60, 61
13	62, 63, 64, 65, 66
14	68, 69, 70, 71
15	72, 74, 75, 76
16	77, 78, 79, 80, 81
17	82, 83, 84, 85, 86

\* 4—5血清型为一群。

4—5 serotypes in a serogroup.

**(二) 549 株非 O1 弧菌的血清学定型**

我们从广东、福建及河南等省搜集的 1985—1986 年分离的菌株中, 经过筛选, 证实表型与霍乱弧菌相同, 而不被 O1 群弧菌血清凝集的 549 株菌进行血清学定型。其中从腹泻患者及健康带菌者分离 362 株, 从外环境(包括水、动物、用器等)分离 187 株。分型结果见表 5。

参加试验的 549 株菌可分 55 型。数量占优势的为 VBO 2、7、9, 其次为 VBO 51、10、13。这六个血清型共 243 株, 占全部菌株的 52.82%。菌型不是平均分布, 不同地区分离的菌株有差异。

血清的分型率为 83.79%, 来源于病人的菌株分型率为 85.64% (83.74—91.23%)。而来源于外环境的菌株分型率为 80.21% (67.74—85.27%)。

**(三) 我国菌株中发现的新血清型**

我们用日本 Sakazaki 及美国 Smith

表5 非 O1 群霍乱弧菌的血清型  
Table 5 The serotypes of vibrio cholerae non-O1

血清型 (VBO) Serotype	病人 Patient				外环境 Environment				共计 Sum total
	1	2	3	合计 Total	1	2	3	合计 Total	
2	19	15	13	47		11		11	58
3	1	2	2	5		6		6	11
5	2	1		3					3
6	2	1		3					3
7	23	10	10	43		11	2	13	56
8	1			1					1
9	6	1	25	32		14	5	19	51
10	12		6	18	2	4	1	7	25
11		3	5	8		7	2	9	17
12					11			11	11
13	12		8	20		2		2	22
14			2	2		1		1	3
16	3	1	1	5	1	3		4	9
18	5			5					5
19						1		1	1
20	5	1		6		1		1	10
22						2	3	4	10
24	5	2	3	10		2		2	12
25					1	2		2	5
26	3	1	3	7		1		1	8
27			1	1		1		1	2
28		2	2	4	3			3	7
30	2			2					2
31	1			1					1
32	4	2		6		7	1	8	14
34	2	2		4		4		4	8
35	8	2		10		1		1	11
36	1			1		1		1	2
38	1		2	3	2	1		3	6
39		1		1		2		2	3
41						1		1	1
43	2			2		1		1	3
45	1	1	3	5		2		2	7
47	4		1	5		1	1	2	7
48	1		3	4		1	1	2	6
49					1			1	1
51	17	2	5	24		6	1	7	31
52	1		1	2					2
54	6		1	7		2		2	9
55		1		1					1
56						1		1	1
58						1		1	1
59	2			2					2
61	1			1					1
62						1		1	1
63							1	1	1
65		1		1		1		1	2
70						2		2	2
71			3	3					3
72			1	1					1
74						1		1	1
78						4		4	4
80	1		1	2					2
84			2	2			1	1	3
85	1			1		1		1	2
共计 Sum total	155	52	103	310	21	110	19	150	460

注：病人及外环境栏内的 1、2、3，表明菌株分别来自广东、河南及福建三个地区。

The number in items of patient and environment represent the source of strains.

1. Guangdong province; 2. Henan province; 3. Fujian province.

表 6 我国分离菌株中的新血清型  
Table 6 New serotypes in strains  
isolated in China

菌株号 (VBO) Strain no.	试验结果* Experimental result	
	Our lab.	Shimada lab.
4	N	N
9	N	N
12	N	N
15	N	N
17	N	Hakata**
22	N	N
24	R(SaO 62)	R(SaO 62)
25	R(SaO 3)	I(SaO 3)
29	N	N
30	N	N
31	R(SaO 69)	I(SaO 69)
35	N	N
36	N	N
41	N	N
42	N	N
48	R(SaO 43)	R(SaO 43)
45	R(SaO 40)	I(SaO 40)
52	R(SaO 54)	I(SaO 54)
86	R(SaO 51)	R(SaO 51)

\* N: 与日本菌株不同的新型; R: 除本型抗原外还有交叉凝集; I: 菌型相同; (SaO...): 有交叉凝集的日本菌株。

\*\* Hakata: 1988 年 Sakazaki 博士发现的新型。

\* N. New serotype, distinguished from sakazaki strain; R. Reciprocal; I. Identical; (SaO...). Responding serotype in sakazaki system.

\*\* Hakata. New serotype was found by Dr. Shimada in 1988.

制造分型血清的菌株对我国 VBO 血清学分型系统的全部分型血清进行测试, 发现其中部分型血清与国外菌株的型别均不相同。经日本 NIH 的 Shimada 博士核对, 现将两个实验室的检查结果对比列于表 6。其中 14 株的结果是一致的, 1 株为日本发现的新菌型, 另 4 株菌在两个实验室中检查是有差别的。日本实验室认为它们与日本的某些菌型相同, 经我们反复检查仅为交叉凝集, 在吸收后可以区别开。

## 讨 论

目前国际上尚没有统一的非 OI 群弧菌血清学分型系统。日本使用 Sakazaki 分型系统<sup>[1]</sup>, 英国公共卫生实验室也采用该系统。美国有 Smith<sup>[6]</sup> 及 Tison<sup>[7]</sup> 两种分型系统。1983 年苏联 Ziyaev<sup>[8]</sup> 报道建立他们的分型系统。在 WHO 支持下, 曾希望在比较 Sakazaki 与 Smith 两个分型系统的基础上, 得出一个统一的方案, 但未获得成功<sup>[9]</sup>。我们建立的 VBO 分型系统, 包括了 Sakazaki 82 型中的 53 个主要血清型, Smith 72 型中的 42 型。有 19 型不属于这两个系统型别之内。在这些新血清型中包括有我国的 VBO 9 及 51 两个优势型。如果使用 Sakazaki 或 Smith 系统检查我国分离的菌株将有三分之一的菌株无法定型。因此建立我国的分型系统是十分必要的。看来形成一个国际统一的分型标准, 还需要做大量工作。

不同国家的分型系统的分型率高低不同, 据文献报告, Sakazaki 分型系统为 68.80—92.05%; Smith 分型系统为 58.46—80.14%; Ziyaev 分型系统为 52.23%; 本文报道的分型率为 57.74—91.23%。我国的分型系统的分型率与当前世界上应用比较广泛的 Sakazaki 系统相等。

非 OI 群弧菌菌型分布与地区性的关系如何, 尚无定论。以我国与邻近的日本作比较, 在我国分离的菌株中, 相当于 Sakazaki 系统的 SaO:5 与 SaO:55 最多, 各占 10.56% 及 10.20%, 而在日本 Shimada 报告中分别为 2.50% 及 0.08%<sup>[10]</sup>, 在 kodama 报告中为 1.49% 及 0%<sup>[11]</sup>, 相差较大。从我国三个省腹泻病人和带菌者分离的菌株作比较, 优势血清型也不完全一致。福建省 VBO 9 型最多, 广东省为 VBO 7, 河南省为 VBO 2。菌株型别的确定有

助于传染源的追索。最近我们已发现在同一病家及同一外环境分离出同一血清型菌株的事例。

非 OI 群霍乱弧菌不仅是人类腹泻的病原菌,也可引起肠道外的疾病,包括中耳炎、外伤性感染、败血症等<sup>[42]</sup>。尤其有肝疾的病人,继发感染非 OI 群弧菌,可加速死亡<sup>[43]</sup>。因而已引起临床医生的重视,并加强了临床细菌检验。这类细菌虽然不能像 OI 群弧菌那样引起世界性霍乱大流行,但它对外环境有较强的适应能力。在不同盐度的水中及水生生物、鸟类以及食草动物体内均可分离到<sup>[44,45]</sup>,已有使家禽及家畜发生腹泻流行的报告。我国人工饲养的对虾<sup>[46]</sup>和实验动物也发现由于感染非 OI 群弧菌而大批死亡。有关病原学及生态学的研究正在深入开展, VBO 血清学分型系统的建立将会加速工作的进程。

非 OI 群霍乱弧菌的血清型别随着国内外工作的进展而不断增加。目前至少有 100 个以上的型别,据 1988 年统计,我国已发现 73 型菌株,为世界上发现菌型最多的国家。

### 参 考 文 献

- [1] Colwell, R. R.: *Vibrio in the Environment*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 299—301, 1984.  
[2] International Committee on Systematic Bacte-

- riology, Subcommittee on Taxonomy of *Vibrios*: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22: 189, 1972,  
[3] Hugh, R. et al.: *J. Conf. Public Health Lab. Direct.*, 30: 133—137, 1972.  
[4] Farmer III, J. J. et al.: *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 282—301, 4th ed., 1985.  
[5] Sakazaki, R. et al.: *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 30: 279—282, 1977.  
[6] Smith, H. L.: *J. Clin. Microbiol.*, 10: 85—90, 1979.  
[7] Tison, D. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 5: 444—445, 1986.  
[8] Ziyayev, S. J. et al.: *J. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 8: 45—46, 1983.  
[9] Brenner, D. J. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16: 319—323, 1982.  
[10] Shimada, T. et al.: *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 56: 1017—1024, 1982.  
[11] Kodama, H. et al.: *Microbiol. Immunol.*, 28: 311—325, 1984.  
[12] Platia, E.: *West. J. Med.*, 132: 354—357, 1980.  
[13] McClesky, F. K.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 85: 644—646, 1986.  
[14] Sakazaki, R. et al.: In *Development in food Microbiology -2*, Robinson R. K. (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, pp. 123—150, 1986.  
[15] Rhodes, J. B.: *J. Clin. Microbiol.*, 28: 572—575, 1985.  
[16] 郑国兴: *水产学报*, 10: 195—202, 1986.

## ESTABLISHMENT AND PRIMARY APPLICATION OF NON-O1 VIBRIO CHOLERAE SEROTYPING SYSTEM (VBO)

Chen Tianshou Tian Wanhong Jiang Fangwu Yuan Peina  
(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

Mo Meiyi  
(Sanitary and Antiepidemic Station of Guangdong Province, Guangzhou)

Chen Gongli  
(Sanitary and Antiepidemic Station of Fujian Province, Fuzhou)

Zhou Yongzhi  
(Sanitary and Antiepidemic Station of Henan Province, Zhengzhou)

A serotyping system for *Vibrio cholerae* non-O1 was reported in this paper. With this typing system, 549 strains isolated from Guangdong province, Fujian province and Henan province were typed. The 55 serotypes were found in these strains. Among this, the dominant types were VBO 2, 7 and 9.

The distribution of serotypes related

with the different region. In our experiment, 19 serotypes were new types, different from sakazaki or smith strains. 83.79% tested strains can be typed with this VBO serotyping system.

### Key words

*Vibrio cholerae* non-O1; Serotyping system