

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(1):80-88; 4 January 2014
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.01.010

溶藻弧菌的毒力相关基因及其对小鼠的致病力

熊盼¹, 彭喜春¹, 魏霜¹, 陈沿廷¹, 赵晖², 唐书泽¹, 吴希阳^{1*}

¹暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东 广州 510632

²湖北省出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 湖北 武汉 430022

摘要:【目的】通过多重 PCR 检测和小鼠动物实验, 对溶藻弧菌环境分离株的毒力因子进行评估, 以期获得较强致病菌株和弱致病菌株之间的差别, 并初步探讨该菌毒力因子对小鼠的致病机理。【方法】采用多重 PCR 体系检测毒力相关基因, 我妻氏血平板溶血实验和平板酶活实验检测溶藻弧菌株的溶血素和胞外酶; 以昆明小白鼠为实验动物, 攻毒方式为灌胃和腹腔注射, 根据小鼠的致病症状和死亡情况分析和对溶藻弧菌的胞外分泌物以及菌体本身的毒性。【结果】10 株溶藻弧菌产淀粉酶、卵磷脂酶的比例为 100%, 脂肪酶、明胶酶次之(为 70%), 脲酶均未被检出; 神奈川现象阳性菌株率为 60%。毒力基因检测的结果显示 10 株溶藻弧菌中 *toxR*、*Collagenase*、*tlh*、*FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur* 这些与毒力有关的基因均有分布, 而 *toxS*、*trh*、*tdh*、*UreR* 并未检出。10 株溶藻弧菌中的 VA009 对小鼠显示了较强的致病性, 能造成腹腔积液, 经腹腔注射感染此菌后 7 d 内死亡率高达 80%。【结论】不同的溶藻弧菌对小鼠的致病性存在较大差异, 溶藻弧菌菌体本身比胞外分泌物对其毒性的贡献要大, 而副溶血弧菌的毒性则由其胞外分泌物起主要作用; 比较我们筛选出的强致病菌株与弱致病菌株, 其上述毒力基因的分布并没有差别, 说明溶藻弧菌可能存在一套与副溶血弧菌不同的独立的毒力基因系统。

关键词: 溶藻弧菌, 毒力相关基因, 致病性, 小鼠

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2014)01-0080-09

弧菌是一类广泛分布于世界范围内的革兰氏阴性杆菌, 是水产养殖中最为常见、流行性最广、危害最为严重的细菌性病原之一。溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 专属性嗜盐, 主要分布在河口、海域地区, 可引起牙鲆和鳎等许多名贵经济鱼类发生细菌性鱼病^[1], 也可引起人食物中毒、肠道炎、伤口感染等, 是一种人和海洋动物共感染的病原菌^[2-4]。

副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌对人类的致病性已经得到广泛重视, 而早在 1979 年 Schmidt 等^[5]就报道了溶藻弧菌对人类的感染, 但目前针对溶藻弧菌的研究主要还是集中在其对水产养殖业的危害上。

许多弧菌对人和海洋生物都有致病性^[6], 可以产生的毒力因子包括蛋白酶类、溶血毒素、细胞毒

基金项目: 2011 年质检公益性行业科研专项项目 (2011110039); 广东省食品安全卫生应急技术研究中心项目 (粤科函社字 (2011) 733)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-85226630; E-mail: tkentwu@jnu.edu.cn

作者简介: 熊盼 (1989-), 女, 湖北天门人, 硕士研究生, 主要从事食品安全研究。E-mail: xiongpanww@126.com

收稿日期: 2013-04-24; 修回日期: 2013-07-11

素、肠毒素、铁载体以及粘附因子等。Baffone 等^[7]对 52 株分离自海水的弧菌 (包括 20 株溶藻弧菌) 的各种酶活、溶血活性以及细胞毒性进行了测定, 发现 20 株溶藻弧菌中产脂肪酶和明胶酶的比率为 100%, 产脲酶的比率为 5%, 产溶血活性的比率为 0, 细胞毒性实验阳性率为 50%。目前, 已知的对副溶血弧菌致病性起主要作用的毒力因子包括耐热性直接溶血毒素 (thermostable direct hemolysin, TDH)、不耐热性溶血毒素 (thermolabile hemolysin, TLH) 和耐热性溶血毒素相关溶血素 (thermostable related hemolysin, TRH), 分别由毒力基因 *tdh*、*tlh* 和 *trh* 编码。1973 年, Sakurai^[8] 指出神奈川现象 (Kanagawa phenomenon, KP) 是由耐热直接溶血毒素 (TDH) 所产生。权太淑等^[9] 报道从溶藻弧菌中检出与副溶血弧菌相同的溶血素 TDH, 并发现有 86.0% 的菌株为神奈川试验阳性, 证明溶藻弧菌的致病性与副溶血弧菌相似。

除了从毒力因子等方面研究弧菌的致病性外, 动物模型在研究病原弧菌对人类的致病机理的过程中也发挥着重要的作用。常用的研究副溶血弧菌的动物模型主要有两种: 家兔回肠结扎模型和小鼠动物模型^[10]。家兔感染副溶血弧菌后会在结扎处形成大量的积液, 出现与人感染后相似的临床症状, 可以进行病理学研究, 其缺点是需要专业的技术人员, 耗时耗力, 不适合大批量实验。直接给小鼠腹腔注射副溶血弧菌菌悬液, 小鼠会因为感染副溶血弧菌引起败血症而死。1990 年, Hoashi 等^[11] 通过腹腔注射和灌胃两种方式研究了副溶血弧菌对小鼠的致病性, 发现其 LD₅₀ (median lethal dose) 分别为 10⁷、10⁸ cfu/g, 两种感染方式死亡小鼠小肠局部内均出现红肿、积液, 在粘膜和粘膜上层组织结构中均能产生如充血、水肿、空泡等现象。目前常用于测定溶藻弧菌毒性大小的海洋动物有大黄鱼、军曹鱼、带点石斑鱼、罗非鱼、对虾等, 而适合研究溶藻弧菌的哺乳动物模型尚未有较深入的报道。

溶藻弧菌致病因子的复杂性及独特性是由弧菌间毒力基因的可变性决定的^[12]。弧菌的产毒机制非常复杂, 不同的弧菌种间存在相同的毒力基因, 而相同的种内也存在不同的毒力基因^[12]。现仅霍乱弧菌 O1 和 O139 的致病机制研究得比较透彻, 其余大多数弧菌的致病机制尚未特别清楚^[13]。目前对溶藻弧菌有关毒力基因及致病机理的研究主要集中

在对海洋生物上, 而溶藻弧菌中可能存在的一些对人类致病的因子研究明显不足。海产品中溶藻弧菌引起人类食物中毒的关键致病因子及其毒力基因的详细报道目前还未见有。因此开展溶藻弧菌对人致病性的研究对于临床和食品安全风险评估都显得尤为重要。

本文拟以副溶血弧菌做参照, 通过对溶藻弧菌毒力基因的检测以及胞外酶活实验、溶血活性实验、小鼠动物毒力实验对其进行毒力评估, 初步探讨溶藻弧菌的毒力因子对哺乳动物尤其是人类的致病机理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养条件: 溶藻弧菌 VA001、VA002、VA003、VA004、VA006、VA008、VA010 由湖北省出入境检验检疫技术中心从海产品中分离; VA005、VA007、VA009 由海南大学周永灿教授馈赠, 分离自海水, 对罗非鱼有强致病性; 对照菌株副溶血弧菌 VP128 (O1: K25, *toxR*⁺ /*tlh*⁺ /*tdh*⁺ /*trh*⁺)^[14] 由上海交通大学农业与生物学院施春雷副教授馈赠, 分离自上海市临床病人; 培养条件为含 2% NaCl 的 TCBS 平板, 28℃ 恒温箱培养。

1.1.2 主要试剂和仪器: TCBS (Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar) 培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (Trypticase Soy Broth, TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂 (Tryptone Soya Agar, TSA) 购自于北京陆桥技术有限公司, 我妻氏培养基购自于青岛海博生物技术有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Bacteria DNA kit, TIANGEN) 购自于生工生物工程 (上海) 有限公司; 多重 PCR 反应试剂盒、dNTPs、*Taq* 酶和 DNA Marker 购自于 TaKaRa, 其余试剂均为国产分析纯试剂; PCR 基因扩增仪 (Mastercycler), Eppendorf 公司; 微量核酸蛋白分析仪 (Nanodrop, ND-1000), 美国 Thermo 公司; 电泳仪、凝胶成像分析系统美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 实验动物: 雌性昆明小白鼠来自暨南大学医学院实验动物中心, 健康, 体重 18 - 22 g。

1.2 溶藻弧菌各种酶活及溶血活性的测定

1.2.1 溶藻弧菌各种酶活的测定: 采用琼脂平板打孔法, 分别用蒸馏水配制无菌的含尿素 (2.0%)、淀

粉(0.2%)、蛋黄(2.5%)、吐温-80(1.0%)、明胶(1.0%)五种琼脂培养基(pH7.5),测定溶藻弧菌的脲酶、淀粉酶、卵磷脂酶、脂肪酶、明胶酶^[7,15]。将10株溶藻弧菌以及VP128在2% NaCl的TCBS培养基上活化后,挑单菌落接种于2% NaCl的TSB液体培养基中,于28℃,150 r/min恒温振荡箱中过夜培养。将各菌液稀释至 OD_{600} 为1.0,分别取20 μ L稀释后的菌液加入打好的孔内,阴性对照组加等量0.85%的生理盐水,35℃温育2 d。向明胶平板加入0.1 mol/L酸性氯化汞溶液,向淀粉平板加入鲁格氏碘液,观察平板,以出现透明圈(明胶平板、淀粉平板)或无透明圈(蛋黄琼脂平板、吐温-80琼脂平板)或变成红色(尿素酶琼脂平板)为阳性,来测定溶藻弧菌可产生的各种酶活。测量阳性圈直径大小,取平均值。

1.2.2 溶藻弧菌溶血性的测定:采用我妻氏血平板法^[16],按照上述平板打孔的方法给血平板打孔。将溶藻弧菌和VP128的菌液稀释至 OD_{600} 为1.0,分别取10 μ L稀释后的菌液加入打好的孔中,空白组加

等量0.85%的生理盐水作阴性对照,35℃温育2 d,观察溶血结果,若能产生明显的溶血现象,即为KP阳性;若不能则为KP阴性。

1.3 溶藻弧菌中毒力基因的检测

1.3.1 引物的设计与合成:由本实验室根据已报道的溶藻弧菌的溶血素有关基因(*tdh*、*trh*、*tlh*)^[17-19]、其他毒力基因(*toxR*、*Collagenase*、*UreR*、*FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur*)^[20-23]以及副溶血弧菌溶血素有关基因(*trh*、*tdh*、*tlh*)^[24]、调控基因(*toxR*、*toxS*)、毒力贡献基因(*Collagenase*、*UreR*、*FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur*)^[25]这些常见毒力相关基因,利用Primer Premier V5.0和Oligo V6.22软件进行引物设计。引物均在溶藻弧菌和副溶血弧菌这些毒力相关基因的保守区域进行设计,设计出的引物均利用Primer premier V5.0中的Multiplex/Nested Primers功能来进行评价和筛选,选择因相互干扰产生二聚体的最小的引物组合,并进行适当修饰而成(表1),以满足多重PCR引物设计的要求。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表1. 目的基因与引物序列

Table 1. Target genes and primer sequences

pool	target genes	GenBank ID	primer sequences (5'→3')	products size/bp	concentration/(μ mol/L)
Pool 1	<i>toxR</i>	AY527397.1	GGATTCAACCAAATCTCCAGAGT GGTCAGAATCAAACGCCG	434	0.4
	<i>Collagenase</i> ^{VP}	AF326572.1	GAAAGTTGAACATCATCAGCACGA GGTCAGAATCAAACGCCG	271	0.2
	<i>toxS</i>	AB063111.1	CCCGTATCTATCCTTTTCAGTGG GCCTTGTCGGAACAGTTTG	228	0.2
	<i>trh</i>	DQ359749.1	GCCTTTCAACGGTCTTCACAA TAACAAACATATGCCATTCCG	179	0.2
	<i>tdh</i>	JQ074092.1	ATAAAGACTATACAATGGCAGCGG GAATAGAACCTTCATCTTCACCAAC	138	0.2
	<i>tlh</i>	GU971655.1	CGAACGAGAACGCAGACATT CTTTGTTGATTTGATCTGGCTG	108	0.2
Pool 2	<i>Collagenase</i> ^{VA}	DQ097161.1	GTACTACGACATTGGCGAAGG CCCGACCATACATTCATACTG	591	0.4
	<i>UreR</i>	AB112354.1	AATGAGTCTGGAGTGGATGTGC TTGCGTTTGAAAGCGTGC	320	0.2
	<i>FlaA</i>	GQ433373.1	AATCAATGGAGCGTTTGTCTTC GCTACACGTTCTGCTTTTGACTTAG	253	0.2
	<i>ompW</i>	DQ425109.1	TCGTGTCACCAAGTGTTCG CGTGGCTGAATGGTGTTCG	213	0.2
	<i>AspA</i>	DQ185575.1	GCATGCTACTCAGTAGCGG CTTTCACAAGACCAGAAGAGTAACC	146	0.2
	<i>fur</i>	AB003752.1	ATTAACCCCTTTGAAGTTCGTGG TGACATATACTTTCCCGTTGGATC	111	0.2

Note: The primers marked with VA and VP (superscript) are specific to *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* respectively.

1.3.2 细菌 DNA 的提取:将溶藻弧菌及副溶血弧菌在 2% NaCl 的 TCBS 培养基上活化后,挑单菌落接种于 2% NaCl 的 TSB 液体培养基中,于 28℃, 150 r/min 恒温振荡箱中过夜培养,取 1 mL 菌液, 10000 × g 离心取菌体,采用试剂盒法提取细菌 DNA,并用微量核酸蛋白分析仪 (Nanodrop, ND-1000) 测定 DNA 的浓度和纯度。

1.3.3 多重 PCR 体系的建立:按照多重 PCR 反应试剂盒 (Multiplex PCR Assay Kit, TaKaRa) 说明书进行,反应体系为 50 μL,包括 Multiplex PCR Mix2 溶液 25 μL、Multiplex PCR Mix1 溶液 0.25 μL、各引物混合物 (浓度见表 1) 和 DNA 模板。反应条件为 94℃ 1 min; 94℃ 30 s, 59℃ 90 s, 72℃ 90 s, 35 cycles; 72℃ 10 min 补足延伸。

1.4 弧菌小鼠动物实验

本实验在暨南大学医学院实验动物中心进行。将小鼠分别称重,同一重量段 (18.0 - 18.9 g) 放入一个笼内,标记小鼠,再按重量顺序分层随机分组,使不同体重的小鼠能均匀分配到各组,每组 10 只,每 5 只一笼饲养。实验前禁食 12 h,自由饮水;实验期间正常喂养。

1.4.1 弧菌菌悬液连续灌胃动物实验:将弧菌分别接种于 TSB 液体培养基,于 28℃, 150 r/min 恒温振荡箱中培养 9 h 左右。培养液在 4℃、8000 × g 下离心 5 min,用 0.85% 的生理盐水洗涤 2 次后重悬菌体,得到浓度约为 1.0×10^9 cfu/mL 的菌悬液。再将菌悬液进行梯度稀释,至菌液浓度为 1.0×10^4 cfu/mL,备用。将高浓度 1.0×10^9 cfu/mL 和低浓度 1.0×10^4 cfu/mL 菌悬液分别灌胃 1 组雌性小鼠,每组 10 只,阴性对照组灌胃无菌生理盐水,灌胃剂量均为 0.2 mL/10 g,每天 1 次,连续灌胃 5 d (死亡的除外) 后停灌 2 天。从灌胃第 2 天起,每天按时取小鼠的新鲜粪便。称取粪便 0.1 g 捣碎,用 900 μL 2.5% NaCl 溶液混匀,进行梯度稀释,取合适的稀释梯度涂布于 TCBS 平板上,于 37℃ 培养 10 - 12 h,观察菌落生长情况及形态特征,经革兰氏染色、镜检等初步鉴定后计数,每株菌做 3 个平行,取平均值。

1.4.2 弧菌菌悬液连续腹腔注射动物实验:将弧菌分别接种于 TSB 液体培养基,于 28℃, 150 r/min 恒温振荡箱中培养 9 h 左右。培养液在 4℃、8000 × g

下离心 5 min,用 0.85% 的生理盐水洗涤 2 次后重悬菌体,得到浓度约为 1.0×10^9 cfu/mL 的菌悬液备用。各株弧菌菌悬液分别腹腔注射 1 组雌性小鼠,每组 10 只,阴性对照组腹腔注射无菌生理盐水,注射剂量均为 0.2 mL/10 g,每天 1 次,连续 3 天 (死亡的除外)。

1.4.3 弧菌上清液连续灌胃和腹腔注射动物实验:将弧菌分别接种于 TSB 液体培养基中,于 28℃, 150 r/min 恒温振荡箱中过夜培养后按 1:100 接种量转接到 50 mL 新鲜的 2% NaCl 的 TSB 培养基中,于相同条件下培养 18 h,达稳定期后期。培养液在 4℃、8000 × g 下离心 5 min,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤放 4℃ 冰箱备用。弧菌上清液分别灌胃和腹腔注射各 1 组雌性小鼠,每组 10 只;阴性对照组 1 灌胃无菌的 TSB 培养基,阴性对照组 2 腹腔注射无菌的 TSB 培养基;灌胃和腹腔注射剂量均为 0.2 mL/10 g。每天 1 次,连续 3 天 (死亡的除外)。

以上 3 组实验均需观察并记录 7 d 内小鼠的饮食、行动、精神、排泄以及死亡等情况,死亡的小鼠进行解剖,观察小鼠肠道内及腹腔内是否有出现红肿、积液等现象。

2 结果

2.1 溶藻弧菌各种酶活及溶血活性的测定

溶藻弧菌可产生多种胞外产物,且具有多种蛋白酶活性,而溶血毒素作为一种胞外产物,已被证明是一种非常重要的且广泛分布在致病性弧菌中的毒力因子,其重要性表现在缺铁环境下,它可以通过释放螯合铁蛋白,如血红蛋白,溶解红细胞来协助获取铁^[17]。溶藻弧菌中与其毒力有关的脲酶、淀粉酶、卵磷脂酶、脂肪酶、明胶酶以及溶血活性实验结果如表 2 所示。10 株溶藻弧菌中产淀粉酶和卵磷脂酶的比例为 100%,脂肪酶、明胶酶次之 (为 70%),脲酶均未被检出;KP 试验阳性的菌株比例为 60%,在我妻氏血平板上产生大小不等的稍不透明的溶血圈,其溶血圈从大到小排序依次为 VA009、VA002、VA003、VA004、VA001、VA005。副溶血弧菌 VP128 产脲酶、淀粉酶以及卵磷脂酶,脂肪酶、明胶酶试验为阴性;KP 试验为阳性,在我妻氏血平板上产生溶血圈,其溶血圈大小相较溶藻弧菌适中。

表 2. 10 株溶藻弧菌和 1 株副溶血弧菌酶活、溶血活性的测定结果

Table 2. The result of enzymatic and hemolytic activity of 10 *V. alginolyticus* strains and a *V. parahaemolyticus* strain

strains	enzymatic and hemolytic activity (mm) /Percent distribution in <i>V. alginolyticus</i>					
	urease /0	amylase /100%	lecithinase /100%	lipase /70%	gelatinase /70%	haemolysin /60%
VA001	-	11.00	10.30	+	10.20	9.13
VA002	-	13.75	19.30	-	11.30	12.37
VA003	-	12.50	11.00	+	10.80	12.17
VA004	-	12.00	15.00	-	11.25	10.00
VA005	-	16.00	25.50	+	-	8.25
VA006	-	11.00	18.90	+	11.50	-
VA007	-	14.00	11.30	+	11.25	-
VA008	-	10.75	12.20	+	-	-
VA009	-	12.00	19.50	+	10.75	12.63
VA010	-	9.75	13.70	-	-	-
VP128	+	12.25	13.50	-	-	9.33

+, positive; -, negative.

2.2 多重 PCR 调查溶藻弧菌中毒力基因的分布

利用已建立的多重 PCR 体系对 10 株溶藻弧菌以及 1 株副溶血弧菌的毒力基因携带情况进行检测,结果如图 1 所示。10 株溶藻弧菌中均检出与溶血毒素相关的 *tlh*,但未检出 *tdh*、*trh*;与脲酶有关的 *UreR* 基因未检测到阳性菌株。与霍乱弧菌肠毒素和毒素协调调节菌毛有关的毒力基因 *toxR*,在溶藻

弧菌中的阳性检出率为 80%;其他毒力贡献基因如 *FlaA*、*ompW*、*AspA*、*fur* 等在溶藻弧菌中均有不同程度的分布,其中 *FlaA*、*ompW*、*fur* 的阳性检出率均为 100%,*AspA* 的阳性检出率为 80%。10 株溶藻弧菌中只有 VA003、VA007 号菌株与其他菌在毒力基因方面有所差异。分离自临床的副溶血弧菌被检出 *toxR*、*Collagenase*、*toxS*、*trh*、*tdh*、*tlh*、*UreR*、*FlaA*、

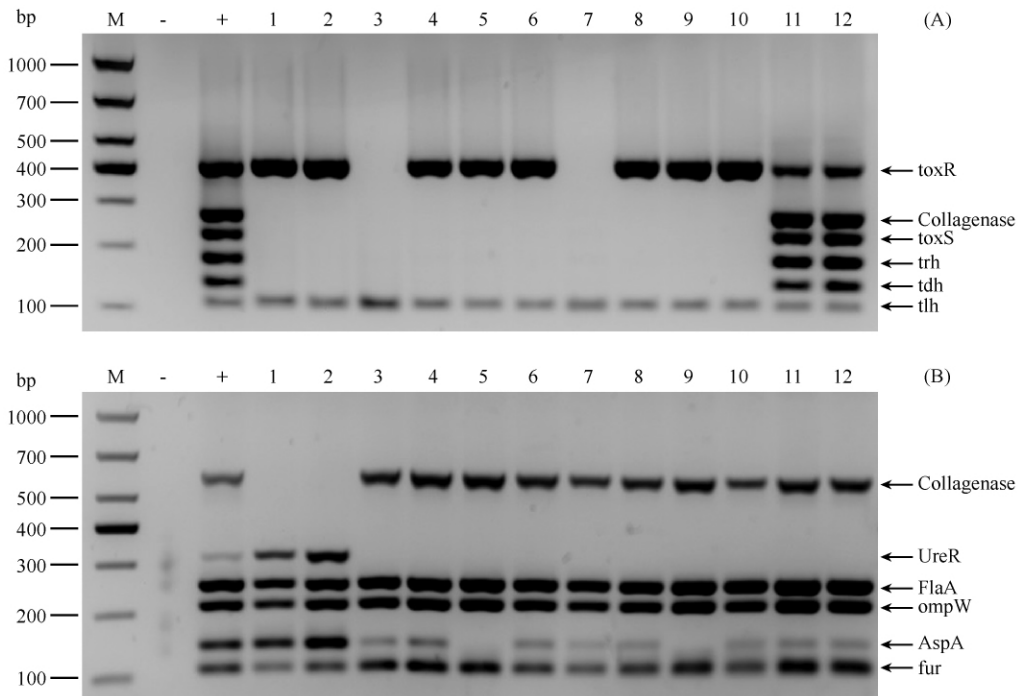


图 1. 第一套引物 (Pool 1) (A) 和第二套引物 (Pool 2) (B) 多重 PCR 检测各毒力基因的分布

Figure 1. The distribution of virulence genes detection by multiplex PCR of using primer-Pool 1 (A) and primer-Pool 2 (B). M: DL1000 DNA marker; lane 1: VA001; lane 2: VA002; lane 3: VA003; lane 4: VA004; lane 5: VA005; lane 6: VA006; lane 7: VA007; lane 8: VA008; lane 9: VA009; lane 10: VA010; lane 11: VP128; lane 12: VP128; +, positive control; -, negative control.

ompW、*AspA*、*fur* 共 11 种毒力基因。

2.3 弧菌动物实验结果

根据灌胃和腹腔注射动物预实验,可以初步判断 10 株溶藻弧菌中毒性较强的 3 株为 VA001、VA006、VA009,毒性较弱的 2 株为 VA002、VA004;并以副溶血弧菌 VP128 做参照。

2.3.1 弧菌菌悬液连续灌胃:小鼠染菌 3 h 后出现毛发蓬松、行动迟缓、蜷卧、反应迟钝、食欲不振等不良反应,未出现如腹泻、呕吐这样的临床症状,停止灌胃后,小鼠的食欲、行动明显改善。灌胃 VA001 高浓度菌悬液组小鼠第 4 天死 1 只,灌胃 VA009 高浓度菌悬液组小鼠第 5 天死 1 只,其余在 7 d 内均无死亡情况。解剖死亡小鼠,发现其腹腔内有黄色脓样液,肠道内容物呈黄色粘稠状,其他器官未发现明显异常。

有研究^[26]指出霍乱弧菌虽然对新生幼鼠有很好的感染力,但是对于发育成熟的小鼠却不具有感染能力,可能原因是发育成熟的小鼠肠道内其他微生物群落抑制了霍乱弧菌的定植和繁殖。而弧菌能否在小鼠肠道内进行定植和大量繁殖,对于其能否发挥其毒性有着至关重要的作用。所以我们对染菌后的小鼠粪便中的弧菌进行了计数。结果显示,从灌胃高浓度 1.0×10^9 cfu/mL 菌悬液的小鼠粪便中皆能分离到弧菌,从灌胃低浓度 1.0×10^4 cfu/mL 菌悬液的小鼠粪便中基本未分离到弧菌,阴性对照组 (Control) 小鼠粪便中未分离到弧菌。图 2 显示了 6 株弧菌实验组小鼠粪便中分离到的菌落数的情况,可以看出粪便中分离出的菌落数随着灌胃天数的增加而逐渐增加,最高可达 10^7 cfu/mL,停止灌胃后菌落数急剧减少,停灌 2 天后已无法从粪便中分离出弧菌。

2.3.2 弧菌菌悬液连续腹腔注射:小鼠染菌后出现的不良反应与 2.3.1 中实验结果类似,但腹腔注射组小鼠的不良反应较灌胃组要严重。小鼠染菌后 10 h 小鼠开始出现死亡,其中 VA009 的致病性最强,7 d 内死亡率达 80%;VA001、VA006 次之,7 d 内死亡率为 60%;VP128、VA002、VA004 致病性最弱,7 d 内无死亡情况(如表 3)。解剖发现注射溶藻弧菌死亡的小鼠腹腔内出现红肿,且均有少量不透明积液,但注射副溶血弧菌 VP128 的小鼠腹腔内没有出现红肿和积液,其他无明显异常现象。死亡的小鼠从其腹腔内积液及肠道内容物可分离到浓度达 10^9 cfu/mL 的弧菌。

2.3.3 弧菌上清液连续灌胃和腹腔注射:小鼠经灌

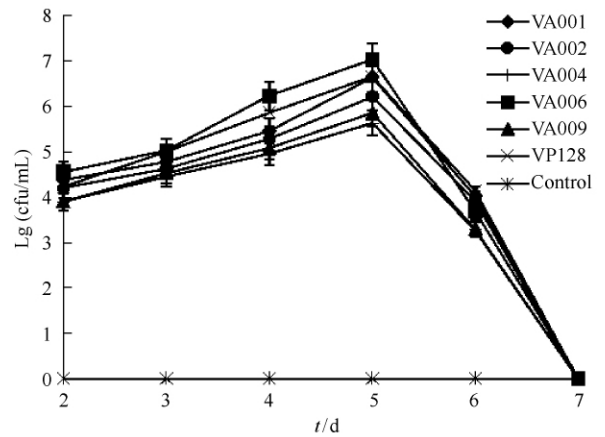


图 2. 高浓度菌悬液灌胃组小鼠粪便中的弧菌计数

Figure 2. The fecal colony-counting of oral-fed mice.

胃和腹腔注射上清液后出现的不良反应与 2.3.1 中实验结果类似,但腹腔注射组小鼠的不良反应较灌胃组要严重。连续灌胃弧菌上清液 3 d,小鼠在 7 d 之内无死亡情况。腹腔注射上清液后 8 h 小鼠开始出现死亡,其中 VP128 致病性最强,7 d 内死亡率达 80%;VA001、VA009、VA006 次之,7 d 内死亡率为 40%、40%、30%;VA002、VA004 致病性最弱,7 d 内死亡率仅为 10% (如表 3)。解剖发现腹腔内均出现红肿和不同程度的积液,其中注射 VP128、VA009、VA006、VA001 死亡的小鼠腹腔内积液较多,VA002、VA004 相对较少。根据小鼠动物毒力实验结果,可以从 10 株溶藻弧菌中筛选出一株强致病菌株为 VA009,以及一株弱致病菌株 VA004。

表 3. 弧菌上清液和菌悬液连续腹腔注射对小鼠的致病性

Table 3. The mice mortality through continuous intraperitoneal injection using culture supernate/bacterial suspension of *Vibrios*.

samples	strains	NO. (test animals)	cumulative mortalities (7d)	mortality
culture supernate	VA001	10	4	40%
	VA002	10	1	10%
	VA004	10	1	10%
	VA006	10	3	30%
	VA009	10	4	40%
	VP128	10	8	80%
bacterial suspension	VA001	10	6	60%
	VA002	10	0	0
	VA004	10	0	0
	VA006	10	6	60%
	VA009	10	8	80%
	VP128	10	0	0

3 结论和讨论

KP 实验是评价副溶血弧菌致病的一个重要指标,比较溶藻弧菌的体外实验与体内实验,可以发现 VA009 的溶血圈最大,其致病性也最强;VA002、VA004 的溶血圈比 VA001 的溶血圈大,但其致病性反而比 VA001 小,说明溶藻弧菌溶血性的强弱与其致病性大小并非呈正比关系。比较副溶血弧菌与溶藻弧菌的溶血圈大小也发现同样的结论,副溶血弧菌的致病性较强,但其溶血活性并不是很强。10 株溶藻弧菌中有 6 株呈 KP 阳性,却并未被检出含有 *tdh*,说明并不是所有能产生溶血现象的溶藻弧菌都含 *tdh*。近年来的研究发现脲酶与 *trh* 有一定的关系,脲酶阳性菌株都具有 *trh*,同时具有 *trh* 的菌株也都有产脲酶的能力^[27]。副溶血弧菌携带脲酶基因 *UreR*,在酶活实验中被检出为脲酶阳性株。10 株溶藻弧菌中脲酶基因未被检出,而酶活性实验中也未检出脲酶阳性株。

多重 PCR 对溶藻弧菌可能携带的毒力基因的检测结果显示,10 株溶藻弧菌均未检出溶血素基因 *tdh* 和 *trh*,表明其在环境溶藻弧菌中的分布率较低,而分离自临床的副溶血弧菌则被检出含有 *tdh* 和 *trh*。有研究表明,临床分离的副溶血弧菌大多携带 *tdh* 基因,而环境分离株中几乎不携带 *tdh*,而 *trh* 无论是在临床还是环境均检出率较低,与本研究结果一致。大量研究表明,无论是临床还是环境分离株,均携带 *tdh*,与本研究结果一致,但 *tdh* 在副溶血弧菌和溶藻弧菌中的功能和其对毒力的贡献尚不清楚。对比我们筛选出的强致病菌株 VA009 与弱致病菌株 VA004,其携带的毒力基因并没有差别,这说明溶藻弧菌可能存在一套与副溶血弧菌不同的独立的毒力基因系统。Xie 等^[28] 针对中国广东沿海地区环境分离的 72 株溶藻弧菌进行 7 种毒力基因的调查以及对鲈鱼的毒力实验,也得出了相似的结论。

通过对小鼠粪便中溶藻弧菌的计数可以发现,灌胃后溶藻弧菌和副溶血弧菌在小鼠肠道内均有一个积蓄的过程,但并未进行大量繁殖,停止灌胃后小鼠体内的弧菌即随着粪便的排出而逐渐排净。这说明溶藻弧菌和副溶血弧菌不能在发育成熟的小鼠肠道内进行大量繁殖。从腹腔注射溶藻弧菌菌悬液致死的小鼠的腹腔内积液及肠道内容物中可以分离到

浓度达 10^9 cfu/mL 的弧菌,这说明腹腔注射的溶藻弧菌可以在小鼠体内大量繁殖,产生的毒性更强,从而达到比灌胃更高的致死率,与动物实验结果相符。

腹腔注射的两组实验结果显示,溶藻弧菌的上清液和菌悬液对小鼠都有一定的致死性,但菌悬液的致死性较高;相比之下,副溶血弧菌的上清液对小鼠有很高的致死性,而菌悬液基本无致死性。这说明溶藻弧菌的菌悬液和上清液对其毒力都有贡献,但菌体本身对其毒力贡献较大;而副溶血弧菌的毒性主要集中在上清液中,其胞外分泌物对其毒力起主要作用。腹腔注射溶藻弧菌可对小鼠腹腔造成积液,这点与人感染的临床症状很相似,但其感染途径与人自然感染溶藻弧菌的途径不一样,且小鼠一般不会出现如腹泻、呕吐这样的临床症状,所以研究溶藻弧菌致病性的新的动物模型有待探索。

本研究首次通过结合体内外实验,对溶藻弧菌对小鼠的致病力进行了比较和分析,为溶藻弧菌对哺乳动物的致病性提供了依据,并将溶藻弧菌与副溶血弧菌的胞外分泌物与菌体本身的毒性进行了对比,发现了溶藻弧菌与副溶血弧菌对小鼠致病性的区别。

参考文献

- [1] Chen Q, Yan Q, Ma S. Progress on pathogenicity research of *Vibrio alginolyticus*. *Marine Sciences*, 2006, 30(8): 83-89. (in Chinese)
陈强, 鄢庆彬, 马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展. 海洋科学, 2006, 30(8): 83-89.
- [2] Daniels NA, Shafaie A. A review of pathogenic *Vibrio* infections for clinicians. *Infections in Medicine*, 2000, 17(10): 665-685.
- [3] Feng H, You J, Liu Y, Li S. Research of a food poisoning outbreak caused by *Vibrio alginolyticus*. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2003, 15(4): 331-334. (in Chinese)
封会茹, 游京蓉, 刘玉堂, 李珊. 溶藻弧菌引起暴发型食物中毒的病原学研究. 中国食品卫生杂志, 2003, 15(4): 331-334.
- [4] Zhang L, Yan B, Qu G. Investigation of an accident involving food poisoning caused by *Vibrio alginolyticus*. *Chinese Journal of Pest Control*, 2005, 21(4): 312-313. (in Chinese)
张灵芝, 闫冰, 曲桂娟. 一起溶藻弧菌引起食物中毒事故的调查报告. 医学动物防制, 2005, 21(4): 312-

- 313.
- [5] Schmidt U, Chmel H, Cobbs C. *Vibrio alginolyticus* infections in humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 1979, 10 (5) : 666-668.
- [6] Thompson FL, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68 : 403-431.
- [7] Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Pianetti A, Campana R, Bruscolini F. Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from sea water. *Food Microbiology*, 2001, 18 (5) : 479-488.
- [8] Sakurai J, Matsuzaki A, Miwatani T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 1973, 8 (5) : 775-780.
- [9] Quan T, Li W, Yang X. Investigation of the pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from patients with diarrhea. *Chinese Journal of Public Health*, 1985, 4 (5) : 15-18. (in Chinese)
权太淑, 李薇, 杨喜玲. 自腹泻患者中分离溶藻弧菌及其病原性的探讨. *中国公共卫生*, 1985, 4 (5) : 15-18.
- [10] 芮浩鹏. 从人到鱼, 主要病原性弧菌的致病机理研究. 华东理工大学博士学位论文, 2010.
- [11] Hoashi K, Ogata K, Taniguchi H, Tsuji K, Mizuguchi Y, Ohtomo N. Pathogenesis of *Vibrio parahaemolyticus*: intraperitoneal and orogastric challenge experiments in mice. *Microbiology and Immunology*, 1990, 34 (4) : 355-366.
- [12] Xie Z, Hu C. The horizontal gene transfer and evolution in *Vibrios*. *Journal of Tropical Oceanography*, 2005, 24 (3) : 86-95. (in Chinese)
谢珍玉, 胡超群. 弧菌毒力基因水平转移与进化的研究进展. *热带海洋学报*, 2005, 24 (3) : 86-95.
- [13] Sechi LA, Duprè I, Deriu A, Fadda G, Zanetti S. Distribution of *Vibrio cholerae* virulence genes among different *Vibrio* species isolated in Sardinia, Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88 : 475-481.
- [14] Chen WY, Xie YP, Xu JY, Wang QZ, Gu M, Yang JL, Zhou M, Wang DP, Shi CL, Shi XM. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the middle-east coastline of China. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153 (3) : 402-412.
- [15] Sudheesh PS, Xu HS. Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in tiger prawn *Penaeus monodon* Fabricius: possible role of extracellular proteases. *Aquaculture*, 2001, 196 : 37-46.
- [16] Wagatsuma S. On a medium to test the hemolytic reaction of *Vibrio parahaemolyticus*. *Media Circle*, 1968, 13 : 159-162 (in Japanese).
- [17] Zhang XH, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98 (1) : 1011-1019.
- [18] Wong SK, Zhang XH, Woo NYS. *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes. *Aquaculture*, 2012, 330-333 : 29-36.
- [19] González-Escalona N, Blackstone GM, Depaola A. Characterization of a *Vibrio alginolyticus* strain, isolated from Alaskan oysters, carrying a hemolysin gene similar to the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (12) : 7925-7929.
- [20] Hare P, Long S, Robb FT, Woods DR. Regulation of exoprotease production by temperature and oxygen in *Vibrio alginolyticus*. *Archives of Microbiology*, 1981, 130 : 276-280.
- [21] Takeuchi H, Shibano Y, Morihara K. Structural gene and complete amino acid sequence of *Vibrio alginolyticus* collagenase. *Biochemical Journal*, 1992, 281 (3) : 703-708.
- [22] Dubrae S, Touati D. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 : 3802-3808.
- [23] Pinto AD, Ciccacese G, Tantillo G, Catalano D, Forte VT. A collagenase-targeted multiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 2005, 68 (1) : 150-153.
- [24] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiology Methods*, 1999, 36 (3) : 215-225.
- [25] Lee JY, Bang YB, Rhee JH, Choi SH. Two-stage nested PCR effectiveness for direct detection of *Vibrio vulnificus* in natural samples. *Journal of Food Science*, 1999, 64 (1) : 158-162.
- [26] Ritchie JM, Waldor MK. *Vibrio cholera* interactions with the gastrointestinal tract: Lessons from animal studies.

Current Topics in Microbiology and Immunology, 2009, 337: 37-59.

- [27] Okuda J, Ishibashi M, Abbott SL, Janda JM, Nishibuchi M. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *tdh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the West Coast of the United States. *Journal of Clinical*

Microbiology, 1997, 35 (8) : 1965-1971.

- [28] Xie ZY, Hu CQ, Chen C, Zhang LP, Ren CH. Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41 (2) : 202-207.

Virulence-related genes of *Vibrio alginolyticus* and its virulence in mice

Pan Xiong¹, Xichun Peng¹, Shuang Wei¹, Yanting Chen¹, Hui Zhao², Shuze Tang¹, Xiyang Wu^{1*}

¹Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China

²Hubei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Inspection and Quarantine Technology Center, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] We determined the virulence factors of *Vibrio alginolyticus* strains isolated from the environment by multiplex PCRs and animal experiments, in order to compare the differences between the highly virulent strain and attenuated virulent strain, and to explore the virulent mechanism of *V. alginolyticus* in mammals. [Methods] The virulence-related genes of *V. alginolyticus* were investigated by multiplex PCRs. Hemolysin and pathogenic proteins were detected using Kanagawa phenomenon tests and enzyme activity tests. *In vivo* pathogenetic tests of *V. alginolyticus* were done through orogastric and intraperitoneal Kunming mouse. [Results] Amylase and lecithinase activities were observed in 100% of the strains, whereas lipase and gelatinase activities were found in only 70% and urease activity was not detected. In Kanagawa phenomenon tests 60% of the strains gave positive results. The related virulence genes such as *toxR*, *Collagenase*, *tlh*, *FlaA*, *ompW*, *AspA* and *fur* were distributed among 10 strains of *V. alginolyticus* collected, with the exception of *toxS*, *trh*, *tdh* and *UreR*. Among those 10 strains, VA009 has shown a strong pathogenesis to the mouse, which caused fluid accumulation and led the mortality rate as high as 80% within 7 days by intraperitoneal infection. [Conclusion] This study indicates that there is a great difference in pathogenicity among *V. alginolyticus* strains to mouse. The cell toxicity of *V. alginolyticus* made more contribution than extracellular secretion, while the extracellular secretion of *V. parahaemolyticus* played a major role in its toxicity. The virulence gene profiles were consistent between the highly virulent and attenuated virulent strains, indicating that *V. alginolyticus* might have a different virulence system and different pathogenic mechanism compared with *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*, virulence-related gene, pathogenesis, mice

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Commonweal and Special Scientific Research Project for Quality Control in 2011 (2011110039) and by the Centre for Food Safety and Sanitation Emergency Response Technical Research Project of Guangdong Province [Guangdong Branch Letter Community (2011) No. 733]

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85226630; E-mail: tkentwu@jnu.edu.cn

Received: 24 April 2013/Revised: 11 July 2013