

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(4):518-523; 4 April 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

2006-2008年深圳市食源性病例和外环境的副溶血性弧菌分离株分型特征比较

段永翔¹, 鞠长燕^{1*}, 刘李², 俞慕华¹, 温群文¹, 曾玲荣¹

¹广东省深圳市南山区疾病预防控制中心, 深圳 518054

²四川大学公共卫生学院, 成都 610041

摘要:【目的】比较深圳市食源性病例和外环境中分离的副溶血性弧菌在血清分布、毒力基因携带情况和分子分型方面的特征。【方法】血清凝集法检测菌株血清型, 多重 PCR 检测毒力基因 *tdh* 和 *trh* 基因携带情况, 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析基因分型特征。【结果】98 株食源性病例分离株的主要血清型为 O3:K6 (40.8%)、O1:KUT (7.1%)、O4:K8 (7.1%), 35 株环境分离株中未发现 O3:K6。83.7% (82/98) 的食源性病例分离株携带 *tdh* 基因、不携带 *trh* 基因, 88.6% (31/35) 的环境分离株不携带 *tdh* 基因和 *trh* 基因。PFGE 显示, 最主要的克隆群是 P1, 包括全部的 O3:K6 (29 株), O4:K68 (4 株), O11:K36 (3 株), O1:K25 (2 株), 都是食源性病例分离株, 没有环境分离株。环境分离株中未见明显的克隆群。【结论】深圳市食源性病例中分离的副溶血性弧菌多数具有溶血性、携带 *tdh* 基因, 不携带 *trh* 基因, 基因分型显示具有优势菌群, 主要血清群为 O3:K6; 环境分离株血清群散在分布, 多数不具溶血性, 不携带 *tdh* 和 *trh* 基因, 基因分布成多态性, 没有发现优势菌群。

关键词: 副溶血性弧菌, 细菌分型技术, 食源性疾病

中图分类号: R378.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 04-0518-06

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp), 一种革兰氏阴性嗜盐的多形态细菌, 广泛分布于近海岸的海水、海底泥沙、浮游生物和鱼、虾、贝类等海产品中, 是引起急性胃肠炎的重要病原菌之一, 也是我国沿海地区食源性疾病的主要病原菌^[1]。

环境中的副溶血性弧菌是食源性疾病的重要传染源, 比较食源性病例和环境中的副溶血性弧菌在血清分布、毒力基因携带情况、分子分型方面的特征, 可以为副溶血性弧菌引发食源性疾病的危险

性评估提供基础资料, 也为揭示副溶血性弧菌的传播机制提供一些线索。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 收集 2006-2008 年深圳市食源性病例的肛拭子样本中分离到的副溶血性弧菌 98 株, 收集从食品、海水、海产品等环境样本分离到的副溶血性弧菌 35 株, 共 133 株 (表 1)。沙门菌

基金项目: 深圳市科技计划项目 (200802139)

* 通信作者。Tel: +86-755-26412825; E-mail: juchy3572@163.com

作者简介: 段永翔 (1964-), 男, 四川人, 硕士, 主任技师, 主要从事卫生检验、质量控制及流行病学。E-mail: szduanyx@163.com

收稿日期: 2010-10-11; 修回日期: 2010-12-29

H9812,作为 PFGE 的分子量标准。

表 1 本试验中副溶血性弧菌分离株来源

Table 1 Source of *V. parahaemolyticus* used in the study

| Source No. of isolates | Total |
|------------------------|-------|
| Cases isolates | 98 |
| Anal swabs | 98 |
| Environmental isolates | 35 |
| Domestic sewage | 1 |
| Fresh meat | 2 |
| Seawater | 3 |
| Seafood | 29 |

1.1.2 主要试剂:副溶血性弧菌琼脂(上海市疾病预防控制中心),副溶血性弧菌诊断血清(日本生研株式会社),SeaKem Gold Agarose (Cambrex Bio Science Rockland),*Xba* I、*Not* I 限制性内切酶(TaKaRa 公司),蛋白酶 K(BBI 公司)。

1.1.3 主要仪器和分析软件:VITEK DENSICHEK 浊度仪(BioMérieux 公司),恒温水浴摇床(GRANT 公司),脉冲场凝胶电泳仪(Bio-Rad CHEF Mapper),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司),BioNumerics 图像分析软件。

1.2 副溶血性弧菌确证及鉴定试验

按照 GB/T 4789.7-2008 副溶血性弧菌检验进行分离培养,革兰染色,生化和盐耐受性试验,确证为副溶血性弧菌后,用副溶血性弧菌诊断血清进行鉴定、分型。

1.3 毒力基因检测

Tdh 和 *trh* 基因的扩增引物参照文献[2]进行。

Tdh 基因的条带为 256bp,*trh* 基因的条带为 500bp。

1.4 脉冲场凝胶电泳

参考文献[3-4]进行。采用 30U 限制性内切酶 *Not* I 于 37℃ 酶切 4h。电泳参数:电压 6V/cm,电场夹角 120°,起始转换时间 10s,终末转换时间 35s,电泳 18h。用凝胶成像软件 Quantity one-4.4.0 获取图像,BioNumerics 分析图像,聚类分析采用非加权组平均法(unweighted pair group method with averages,UPGMA)方法和 Dice 系数,按 tolerance1.5%,optimization1.5% 绘制聚类图。

2 结果

2.1 确证试验

经分离培养,革兰染色,生化和盐耐受性试验及血清学鉴定,确证为副溶血性弧菌。

2.2 副溶血性弧菌菌群分布

本次试验中收集到的 98 株食源性病例分离株分布于八个 O 群中(表 2),其中 O3:K6 占 40.8%,O1:KUT(K 不定型)占 7.1%,O4:K8 占 7.1%,K 抗原不能分型的菌株占 19.4%。

35 株环境分离株分布于 10 个 O 群中,前 3 位比例最高的血清型为 O3:KUT(14.3%)、O1:KUT(11.4%)和 O2:K3(11.4%),K 抗原不能分型的菌株占 40%。环境分离株中未检出 O3:K6,O4:K68,O4:K8。

表 2 本试验中副溶血性弧菌的血清群分布(株)

Table 2 Serogroup distribution of *V. parahaemolyticus* used in the study(No. of isolates)

| | O serogroup | | | | | | | | | | total |
|------------------------|-------------|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-------|
| | O1 | O2 | O3 | O4 | O5 | O6 | O7 | O8 | O10 | O11 | |
| Cases isolates | 16 | 1 | 48 | 22 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 | 3 | 98 |
| Environmental isolates | 6 | 6 | 9 | 3 | 1 | 1 | 2 | 5 | 1 | 1 | 35 |

2.3 毒力基因的分布

食源性病例分离株中,83.7%(82/98)的菌株携带 *tdh* 基因,不携带 *trh* 基因;有 3 株菌同时携带 *tdh* 和 *trh* 基因;13 株菌两种基因都不携带;无单独携带 *trh* 基因的菌株;40 株 O3:K6 全部携带 *tdh* 基因,不携带 *trh* 基因。

环境分离株中,88.6%(31/35)的菌株两种基因都不携带;有 3 株携带 *trh* 基因,不携带 *tdh* 基因;1 株菌携带 *tdh* 基因,不携带 *trh* 基因;无同时携带

两种基因的菌株。

2.4 脉冲场凝胶电泳分型

114 株副溶血性弧菌得出了 PFGE 图谱,各菌株的 DNA 条带为 12-20 条,大小在 20-1135 kb 之间。19 株菌未能得到 PFGE 电泳图谱,包括 11 株 O3:K6,2 株 O1:KUT,2 株 O3:KUT,1 株 O4:K34,1 株 O4:KUT,1 株 O5:K17,1 株 O6:K18,除血清型为 O6:K18 的菌株是环境分离株外,其它 18 株均为食源性病例分离株。这些菌株电泳后仅出现拖尾的一

条带,在试验过程中延长了细胞裂解以及内切酶酶切时间,重复试验2-3次,均未能得到电泳条带,可能与DNA降解有关。

114株菌株组成的聚类分析图中,最主要的克隆群P1(图1),相似系数>86.9%,克隆群P1共有40株菌,包括全部的O3:K6(29株),O4:K68(4株),O11:K36(3株),O1:K25(2株)和部分O1:KUT(2株),都是食源性病例分离株,没有环境分离

株。另一个较小的克隆群是P2,相似系数>88.9%,包括7株O4:K8,也全部是食源性病例分离株。环境分离株中,34株菌可得到31个PFGE带型,未发现明显的克隆群(图2),环境分离株VP069(O8:K41)与食源性病例分离株VP079(O8:K41)和VP080(O8:K41)遗传关系最接近,相似系数>87.7%。其它环境分离株与食源性病例分离株在遗传关系上不相关。

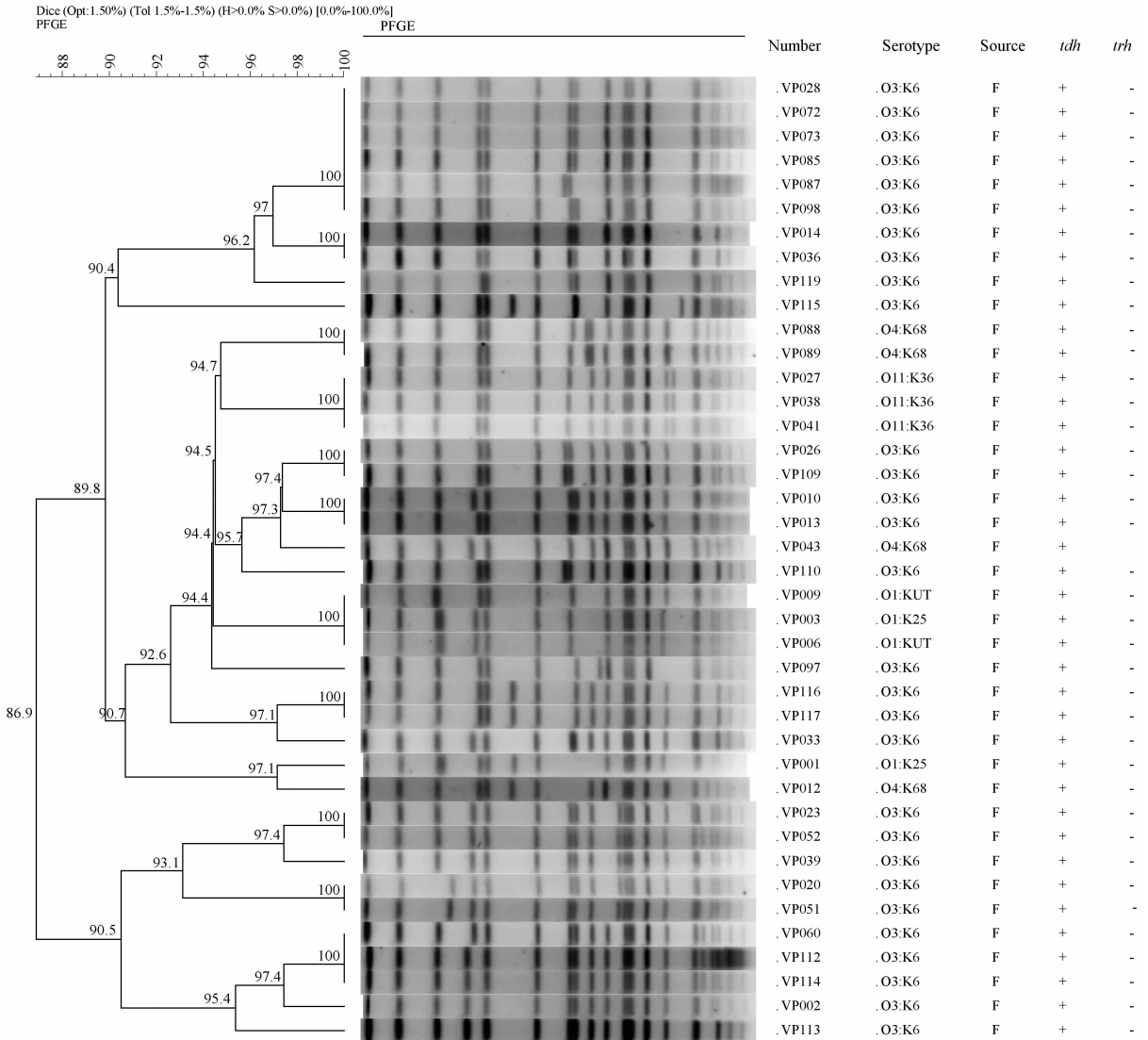


图1 40株食源性病例分离株组成的克隆群P1(F为食源性病例)

Fig. 1 Clone P1 comprises 40 *V. parahaemolyticus* isolates from cases of foodborne disease. F, cases of foodborne disease; +, positive; -, negative.

3 讨论

1995年以来,一种新的O3:K6迅速成为世界范

围内流行的主要血清群,PFGE和GS-PCR的结果显示,这种新的O3:K6与1995年前的O3:K6在基因上不相关,两者的毒力和致病力没有明显差别^[5],

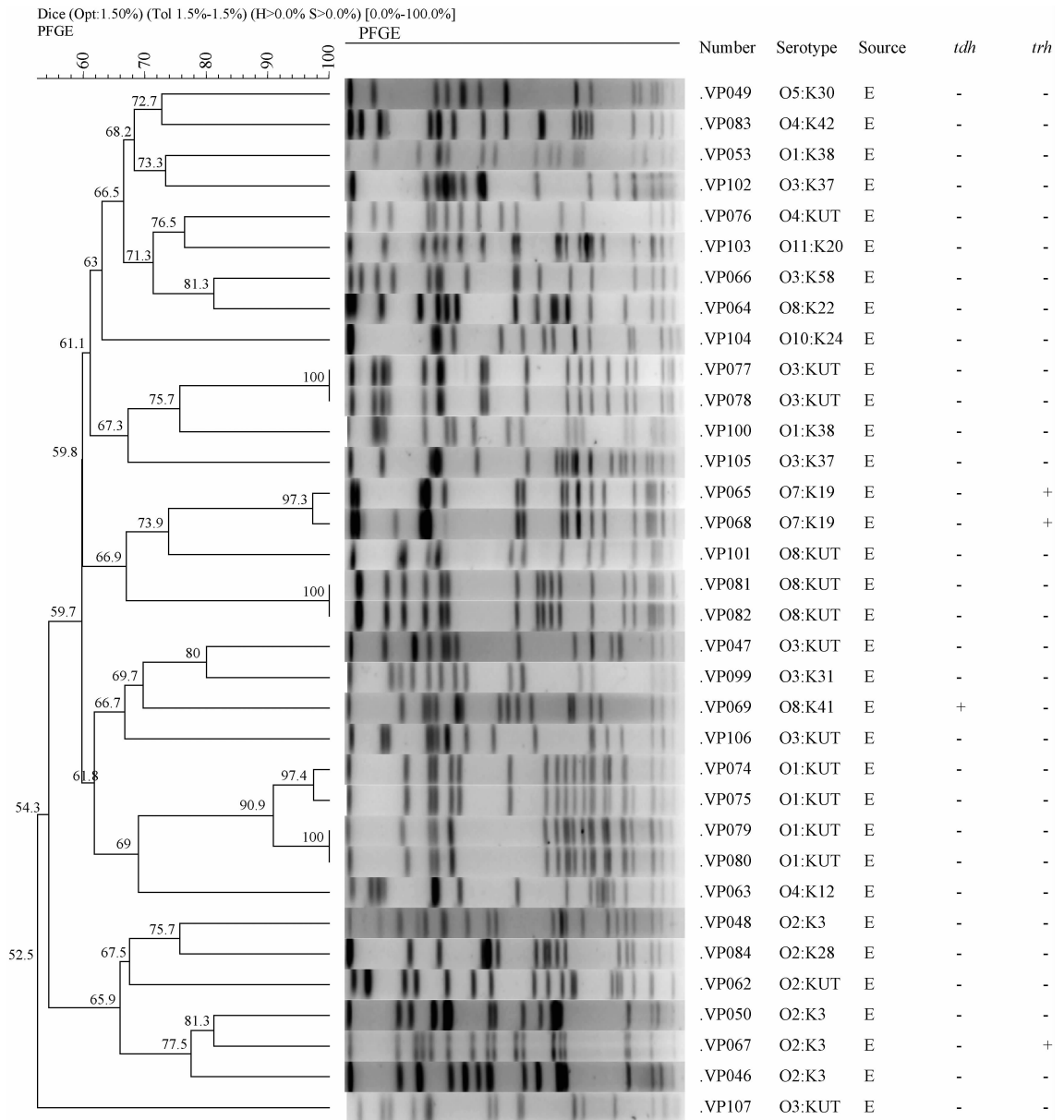


图2 34株环境分离株的PFGE聚类分析图(E为外环境)

Fig. 2 PFGE patterns of 34 *V. parahaemolyticus* isolates from environment. E, environment; +, positive; -, negative.

研究者推测这种新的 O3:K6 具有其它血清群不具备的特征,一是可以快速定植,二是变为优势血清群,排挤掉之前的优势血清群^[6]。本次收集的菌株中,98株食源性病例分离株可分为24种血清型,以 O3:K6 为主(40.8%),与国内外的报道一致^[6-8],还有4株 O4:K68,2株 O1:K25,7株 O4:K8。35株环境分离株可分为20种血清型,未发现占优势的血清型。本次在环境中没有检出 O3:K6, O4:K68 和 O1:K25,国外的报道也显示^[9],极少在海水、海产品等环境样品中检出 O3:K6 及 PFGE 图谱与 O3:K6

密切相关的 O4:K68 和 O1:K25,可能是 O3:K6 在环境中存在的比例较低,目前的方法检出限无法检出,需要高灵敏度的检测技术分离 O3:K6。

资料显示^[10],副溶血性弧菌食源性病例分离株多数可产生一种耐热直接溶血素(TDH),可以裂解莪萘氏血平板上的红细胞,产生溶血环,是目前所知的副溶血性弧菌主要的毒力因子,另外一种 TDH 相关的溶血素 TRH 被认为与脲酶的产生有关,也被认为是副溶血性弧菌的毒力因子之一。本次收集的菌株中,83.7%的食源性病例分离株携带 *tdh* 基因,不

携带 *trh* 基因。未发现单独携带 *trh* 基因的食源性病例分离株,与方维焕等的研究结果类似^[11],说明 *trh* 基因在该菌致病过程中是否发挥作用尚不清楚。88.6%的环境分离株都未检出 *tdh* 和 *trh* 基因,有 1 株环境分离株携带 *tdh* 基因(血清型为 O8:K41),有 3 株环境分离株携带 *trh* 基因(2 株血清型为 O7:K19,1 株为 O2:K3)。日本研究者发现^[12],1983~1988 年分离的 4 株 *tdh* 阴性的 O3:K6,最近经过 AP-PCR,发现 *toxRS* 序列与致病性 O3:K6 克隆群完全一致,所以 Okura 等人猜测,无致病性的菌株,通过某种途径获得 *tdh* 基因后,转变为有致病力的 O3:K6。王淑娜等也发现^[13],副溶血性弧菌海产品分离株 *tdh* 基因区域具有多态性且存在类插入序列,是毒力基因水平转移的佐证。

PFGE 是目前用于副溶血性弧菌分子分型的国际通用方法。本试验结果表明,引发深圳市食源性疾病的副溶血性弧菌是一群遗传关系密切的菌群,即克隆群 P1,除 29 株 O3:K6 外,克隆群 P1 还包含 4 株 O4:K68,3 株 O11:K36,2 株 O1:K25 和 2 株 O1:KUT,它们与 O3:K6 遗传关系密切,毒力基因携带情况也完全一致(均携带 *tdh* 基因,不携带 *trh* 基因),有研究者推测 O3:K6 为适应环境变化或免疫压力会改变 O:K 抗原产生“血清变异型”^[6],本试验的结果为这一假说提供了证据。

环境分离株中电泳带型分散,没有发现明显的克隆群。有 1 株环境分离株 VP069,海产品中分离,血清型为 O8:K41,是本试验中唯一携带 *tdh* 基因的环境分离株,与食源性病例中分离到的 2 株 O8:K41 (*tdh*+) 图谱比较接近,相似系数达到 87.7% (PFGE 结果),有 5 条带的差异,按照 Tenover 的菌株同源性标准,为遗传可能相关菌株,需要对该菌株提高重视,加强海产品监测。其它环境分离株与食源性病例分离株为遗传不相关株。

本实验分离出 3 株 O11:K36,都是食源性病例分离株,携带 *tdh* 基因,不携带 *trh* 基因,PFGE 图谱显示,其带型与 O3:K6 十分接近,相似系数大于 90%,说明遗传上与 O3:K6 紧密相关。O11:K36 尚不在目前公认的 21 个“血清变异型”之列^[6],它是否是 O3:K6 的又一个血清变异型? 还需要后续 *toxRS* 测序结果的支持。

参考文献

- [1] 刘秀梅,程苏云,陈艳,袁宝君,戴建华. 2003 年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测. 中国食品卫生杂志 (*Chinese Journal of Food Hygiene*), 2005, 17(2): 97-99.
- [2] Panicker G, Call DR, Krug MJ, Bej AK. Detection of Pathogenic *Vibrio* spp. in Shellfish by Using Multiplex PCR and DNA Microarrays. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7436-7444.
- [3] Parsons MB, Cooper KL, Kubota KA, Puhf N, Simington S, Calimlim PS, Schoonmaker-Bopp D, Bopp C, Swanminathan B, Gerner-Smidt P, Ribot EM. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2007, 4(3): 285-292.
- [4] Kam KM, Luey CK, Parsons MB, Cooper KL, Nair GB, Alam M, Islam MA, Cheung, D T Chu YW, Ramamurthy T, Pazhani GP, Bhattacharya SK, Watanabe H, Terajima J, Arakawa E, Ratchtrachenchai OA, Huttayanant S, Ribot EM, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(8): 2766-2773.
- [5] Wong HC, Chen CH, Chung YJ, Liu SH, Wang TK, Lee CL, Chiou CS, Liu DP, Nishibuchi M, Lee BK. Characterization of new O3: K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(3): 572-580.
- [6] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(1): 39-48.
- [7] 张蔚,潘劲草,孟冬梅,陈坤. 杭州地区 2000-2002 年副溶血弧菌的分子分型研究. 中华流行病学杂志 (*Chinese Journal of Epidemiology*), 2006, 27(4): 343-346.
- [8] 曹严华. 日本 1996-1998 年的副溶血弧菌感染. 疾病监测 (*Disease Surveillance*), 2000, 15(10): 396-397.
- [9] Wagley S, Koofhethile K, Wing JB, Rangdale R. Comparison of *V. parahaemolyticus* isolated from seafoods and cases of gastrointestinal disease in the UK. *International Journal of Environmental Health Research*, 2008, 18(4): 283-293.

- [10] 张蔚,潘劲草,陈坤. 副溶血性弧菌的分子流行病学研究进展. 国外医学:流行病学传染病学分册 (*Foreign Medical Sciences Epidemiology Lemology*), 2004,31(4):182-184,190.
- [11] 潘自降,坎布,沈飙,娄高明,方维焕,程苏云,梅玲玲. 副溶血弧菌海产品和临床分离株的表型及溶血素相关基因分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007,47(3):508-511.
- [12] Okura M, Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, Terajima J, Watanabe H. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003,41(10):4676-4682.
- [13] 王淑娜, VONGXAY K, 沈飏, 周向阳, 金培婕, 陈健舜, 方维焕. 副溶血弧菌海产品分离株 *tdh* 基因及其临近区域结构分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009,49(12):1576-1583.

Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* obtained from environment and cases of foodborne disease in Shenzhen, during 2006 – 2008

Yongxiang Duan¹, Changyan Ju^{1*}, Li Liu², Muhua Yu¹, Qunwen Wen¹, Lingrong Zeng¹

¹Center for Disease Control and Prevention in Nanshan, Shenzhen 518054, China

²Department of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: [**Objective**] To analyze the serological and genetic divergence in the *Vibrio parahaemolyticus* from environment and cases of foodborne disease, and to compare these two groups in terms of virulence and other biological traits.

[**Methods**] Serotyping, multi-PCR, and pulse-field gel electrophoresis (PFGE) were carried out. [**Results**] The main serotypes of cases isolates were O3:K6 (40.8%), O1:KUT (7.1%), O4:K8 (7.1%), and the main serotypes of environmental isolates were O3:KUT (14.2%), O1:KUT (11.4%) and O2:K3 (11.4%). No O3:K6 strain was isolated from environment. Most cases isolates were *tdh* positive and *trh* negative, which account for 83.7%, while most environmental isolates were *tdh* negative and *trh* negative, which account for 88.6%. PFGE indicated that Clone P1 was the dominant clone cluster, including serotype O3:K6 (29 isolates), O4:K68 (4 isolates), O11:K36 (3 isolates), O1:K25 (2 isolates), and these strains were all obtained from cases of foodborne disease. No dominant clone cluster was found in environmental isolates. [**Conclusions**] *V. parahaemolyticus* from cases of foodborne disease in Shenzhen mostly were hemolytic, *tdh* positive and *trh* negative, there were dominant PFGE type in cases isolates, the main serotype was O3:K6, while environmental isolates mostly were non-hemolytic, *tdh* negative and *trh* negative, no dominant PFGE type was found.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, bacterial typing techniques, foodborne disease

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Technology Programme of Shenzhen(200802139)

* Corresponding author. Tel: +86-755-26412825; E-mail: juchy3572@163.com

Received:11 October 2010/ Revised:29 December 2010