

2013,24(2):182-185.

[16] 杨小蓉,李莉,颜雯雯,等.沙门菌在皮蛋中的定量生长状况分析[J].预防医学情报杂志,2015,31(8):24-26.

[17] 王梓璇,王小龙,蔡媛媛,等.2017年四川省内江市鼠伤寒沙门氏菌监测与分子分型研究[J].疾病监测,2018,33(5):397-401.

风险监测

2019年浙江省湖州市副溶血性弧菌病原学特征分析

严伟,沈月华,徐德顺

(湖州市疾病预防控制中心,浙江湖州 313000)

摘要:目的 了解2019年浙江省湖州市副溶血性弧菌检出株的血清型别、毒力基因携带情况、抗生素敏感性以及分子分型特征。方法 收集湖州市2019年分离到的92株副溶血性弧菌阳性菌株,并对其开展血清学试验、毒力基因检测、抗生素敏感性试验和脉冲场凝胶电泳分子分型。结果 病例源菌株主要血清型为O3:K6,毒力基因型为 $tlh^+tdh^+trh^-$,食品源主要血清型为O2:Kut,毒力基因型为 $tlh^+tdh^-trh^-$ 。分离株对氯苄西林有很高的耐药性,耐药率达到90.22%(83/92);其次为庆大霉素和四环素。分子分型显示,经Not I酶酶切后,91株副溶血性弧菌产生81个PFGE带型,相似度达到85.00%以上的克隆系有16个。结论 2019年湖州市副溶血性弧菌菌型多样性可能是疾病高发的原因之一。淡水产品和海水产品可能存在交叉污染,需加强相应监管。

关键词:副溶血性弧菌;病原学特征;分子分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)01-0074-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.01.015

Etiologic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* stains in Huzhou of Zhejiang in 2019

YAN Wei, SHEN Yuehua, XU Deshun

(Huzhou Prefectural Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Huzhou 313000, China)

Abstract: Objective To investigate the serotypes, virulence genes, antimicrobial resistance and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Huzhou of Zhejiang Province. **Methods** Isolates of 92 *V. parahaemolyticus* in Huzhou were analyzed by serological typing, virulence gene detection, antibiotic resistance testing, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for molecular typing. **Results** O3:K6 was the main serotype and $tlh^+tdh^+trh^-$ was the most frequently detected virulence genotype in clinical strains. O2:Kut was the main serotype and $tlh^+tdh^-trh^-$ was the most frequently detected virulence genotype in environmental strains. Antibiotic resistance testing indicated that the isolates were highly resistant to ampicillin (90.22%, 83/92), followed by gentamicin and tetracycline. Following the restriction enzyme Not I digestion, the 91 strains yielded 81 PFGE patterns, and 16 clones had similarity values of >85.00%. **Conclusion** The etiologic characteristics of *V. parahaemolyticus* varied, which might be one of the reasons for high incidence of foodborne disease in Huzhou. There may be cross-contamination between freshwater and seawater products, so it is necessary to strengthen supervision of food processing.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; etiologic characteristic; molecular typing

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp) 是

一种革兰阴性嗜盐杆菌,广泛存在于近海岸的海水、海底沉淀物和鱼、虾、贝类等水产品中,是沿海地区引起感染性腹泻的主要病原菌之一^[1-2],可引起急性胃肠炎和原发性败血症。1950年,Vp首次在日本一起食物中毒事件中检出,该事件由于摄入了半干的小沙丁鱼造成了至少272人患病,20人死亡^[3]。近年来,随着海产品越来越多的运往内陆地区供人们消费,内陆地区Vp感染病例逐年升高^[4]。湖州虽然地处内陆地区,但当地居民有喜食海鲜的习惯,Vp已经成为引起湖州地区感染性腹泻最主要

收稿日期:2020-11-05

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2019KY683);浙江省传染病疫苗与预防控制研究重点实验室开放基金(浙疾办[2019]46号)

作者简介:严伟 男 主管技师 研究方向为微生物检验 E-mail: 330367825@qq.com

通信作者:徐德顺 男 主任技师 研究方向为微生物检验 E-mail: 574831399@qq.com

的病原菌^[5]。2019年湖州市食源性疾病监测及食品安全风险监测共分离V_p菌株92株,为了解这些菌株之间分布和进化情况,对V_p引起的疾病进行预警和溯源,本研究对分离的菌株进行血清分型、毒力基因、抗生素敏感试验检测,并结合脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)进行分子特征分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

收集2019年湖州市分离的V_p阳性菌株92株。其中在食源性疾病监测系统中分离患者标本得到54株,食品安全风险监测中分离食品样品得到38株。PFGE标准菌株为布伦登卢普沙门菌(H9812)^[6],来源于浙江省疾病预防控制中心。

1.1.2 主要仪器与试剂

PFGE仪(CHEF Mapper XA)、凝胶成像仪(GelDoc XR+)均购自美国Bio-Rad,荧光聚合酶链式反应(PCR)仪(7500,美国ABI),全自动细菌鉴定仪(Vitek 2 Compact,法国梅里埃),去离子水系统(美国Milipore),全自动微生物鉴定与药敏分析系统(AIM+Vizion,美国ThermoFisher)。

V_p诊断血清(日本生研株式会社),限制性内切酶Xba I、Not I(日本TaKaRa),琼脂糖(SeaKem Gold,美国Lonza),蛋白酶K(美国Merck),V_p(*tdh*、*trh*、*tlh*)三重核酸检验试剂盒(荧光PCR法)(深圳生科原生物股份有限公司),弧菌显色平板(法国CHROMagar)。

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离鉴定

食品源菌株的分离鉴定按照GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[7]进行;病例源标本的处理是先将标本接种于3%NaCl碱性胨水37℃增菌16h,取增菌液接种于弧菌显色平板,放置于37℃培养箱培养18h,然后从平板上挑取可疑菌落于细菌生化鉴定仪上鉴定,最后确定V_p阳性菌株。

1.2.2 血清学试验

分离纯化后的阳性菌株接种于3%NaCl TSA平板上,37℃培养18h后挑取单个菌落做玻片凝集K抗原。O抗原凝集需取新鲜培养菌落至3%NaCl盐水管中,研磨制成浓度均匀的菌悬液,放入121℃高压灭菌1h,取出后4000 r/min离心10 min,弃去上清液,沉淀重悬于少量生理盐水中。此菌悬液用于检测O抗原,凝集时同时用生理盐水对照。

1.2.3 毒力基因检测

煮沸法提取DNA。首先挑取一环新鲜菌落于200 μL灭菌水充分研磨,然后将菌悬液置于100℃水浴10 min,水浴后1000 r/min离心5 min,此时上清液即为含菌株DNA的悬液,置-20℃冰箱备用。对全部92株V_p菌株进行毒力基因检测,采用V_p(*tdh*、*trh*、*tlh*)三重核酸检验试剂盒(荧光PCR法),按照试剂盒说明书要求配制反应体系,设置反应条件,样品加好后置于7500荧光定量PCR反应仪,检测*tdh*、*trh*、*tlh*三种毒力基因。

1.2.4 抗生素敏感性试验

参照临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)制定的标准,采用最低抑菌浓度(MIC)法进行抗生素敏感试验。选用的10种抗生素分别为氨苄西林(ampicillin, AMP)、四环素(tetracycline, TET)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、复方新诺明(compound sulfamethoxazole, SXT)、头孢他啶(ceftazidime, CAZ)、庆大霉素(gentamicin, GEN)、亚胺培南(imipenem, IMI)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、阿米卡星(amikacin, AMI)、左氧氟沙星(levofloxacin, LEV)。结果判定标准参照CLSI药敏试验指南中规定的“其他非肠杆菌科菌的解释标准”。药敏质控菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922)。

1.2.5 PFGE分子分型

参照国家致病菌识别网的V_p PFGE标准操作方法^[8]。选用Not I为限制性内切酶,对V_p DNA消化酶切后进行PFGE,并以H9812为标准菌株。电泳条件设置为:片段大小78~396 kb,电泳时间19 h,脉冲时间10~35 s,电泳结束后GelRed染色成像观察条带,将所得全部条带上传至国家致病菌识别网,并进行聚类分析。按照Tenover原则判断菌株间关系:即酶切后图谱完全一致定为同一菌株型;图谱有1~3条带不同者,可认为菌株间关系较密切;图谱有3条以上条带不同者认为菌株间关系不密切^[9]。

2 结果

2.1 血清型分布

2019年湖州市食源性疾病监测系统分离得到54株病例源V_p,通过血清学分型可以分为6种血清型,主要型别为O3:K6(64.81%,35/54),其次为O4:Kut(18.52%,10/54)。在食品安全风险监测中分离得到38株食品源V_p,血清凝集后得到9种血清型,主要型别为O2:Kut(21.05%,8/38),其次是O5:Kut(18.42%,7/38),见表1。

表1 2019年Vp血清型分布

Table 1 Serotype distribution of Vp in 2019

血清型	食品		患者	
	菌株数	构成比/%	菌株数	构成比/%
O3:K6	35	64.81	0	0.00
O4:K8	1	1.85	0	0.00
O4:Kut	10	18.52	4	10.53
O3:Kut	6	11.11	4	10.53
O1:Kut	1	1.85	6	15.79
O2:Kut	0	0.00	8	21.05
O2:K3	0	0.00	1	2.63
O2:K28	0	0.00	4	10.53
O5:Kut	1	1.85	7	18.42
O5:K17	0	0.00	1	2.63
O10:Kut	0	0.00	3	7.89
合计	54	100.00	38	100.00

2.2 毒力基因分布

92株Vp均做了毒力基因检测。经过荧光定量PCR检测,所有Vp分离株 tlh^+ ,毒力基因型别主要以 $tlh^+tdh^+trh^-$ 和 $tlh^+tdh^-trh^-$ 为主。 $tlh^+tdh^+trh^-$ 是病例源的主要基因型(92.59%,50/54)。 $tlh^+tdh^-trh^-$ 是食品源的主要基因型(84.21%,32/34),见表2。

表2 2019年Vp毒力基因分布

Table 2 Distribution of virulence genotypes of Vp in 2019

毒力基因型	食品		患者	
	菌株数	构成比/%	菌株数	构成比/%
$tlh^+tdh^+trh^-$	6	15.79	50	92.59
$tlh^+tdh^-trh^-$	32	84.21	3	5.56
$tlh^+tdh^-trh^+$	0	0.00	1	1.85
合计	38	100.00	54	100.00

2.3 抗生素敏感试验

对92株Vp进行抗生素敏感试验。结果显示Vp对AMP有很强的耐药性,耐药率达90.22%(83/92);其次为GEN和TET,耐药率分别为4.35%(4/92)和2.17%(2/92);其他7种抗生素则均敏感,见表3。

表3 2019年92株Vp抗生素敏感试验[% (株)]

Table 3 Antimicrobial susceptibility testing of 92 Vp in 2019

药物	敏感	中度敏感	耐药
AMP	1.09 (1)	8.70 (8)	90.22 (83)
TET	93.48 (86)	4.35 (4)	2.17 (2)
CHL	100.00 (92)	0.00 (0)	0.00 (0)
SXT	98.91 (91)	1.09 (1)	0.00 (0)
CAZ	100.00 (92)	0.00 (0)	0.00 (0)
GEN	89.13 (82)	6.52 (6)	4.35 (4)
IMI	100.00 (92)	0.00 (0)	0.00 (0)
CIP	100.00 (92)	0.00 (0)	0.00 (0)
AMI	97.83 (90)	2.17 (2)	0.00 (0)
LEV	100.00 (92)	0.00 (0)	0.00 (0)

2.4 PFGE分子分型情况

92株Vp菌株用限制性内切酶Not I酶消化后,进行PFGE,1株菌降解,共得到有效图谱91个,其中38个来源于食品,53个来源于患者(见图1)。

使用国家致病菌识别网的软件进行分析,根据条带的数量和位置的不同,共得到81个不同PFGE型别。相似度达到85.00%以上的克隆系有16个,按照聚类图从上到下其相似度分别为87.50%(2株)、93.10%(2株)、86.67%(2株)、85.24%(5株)、100.00%(2株)、86.67%(2株)、89.89%(3株)、86.44%(5株)、93.94%(3株)、88.24%(2株)、93.55%(3株)、92.59%(3株)、85.87%(5株)、86.67%(2株)、100.00%(2株)、100.00%(2株),其余46株之间的相似度小于85.00%。

3 讨论

Vp是导致食物中毒和感染性腹泻的重要病原体。据文献报道,Vp引起的食物中毒目前已超过沙门菌,位居细菌性食物中毒之首^[10-11]。Vp引起的食源性疾病发病率高低与当地海产养殖密切相关^[12]。湖州素有“鱼米之乡”之称,水产养殖业发达,近年来水产品消费量大,Vp所引起的食品安全危害日益突显。

耐热直接溶血素(tdh)和耐热相关溶血素(trh)是Vp主要毒力因子^[13]。近年来的研究发现无论是病例源还是外环境和食品源的分离株均携带不耐热溶血素(tlh)基因,它具有种属特异性但无致病性^[14]。 tdh 可介导神奈川现象的产生,而几乎所有的病例源菌株均能产生神奈川现象,该现象决定了Vp致病力的强弱; trh 具有与 tdh 相似的毒性,如肠毒素作用。本研究中92株Vp分离株均为 tlh^+ ,与阳性菌株生化特征相符,进一步证实其均为Vp。病例源菌株92.59%为 tdh^+ 和 trh^- ,其具有较强的致病力;而食品源菌株84.21%为 tdh^- 和 trh^- ,毒力相对较弱,结果与李雪等^[15]报道相似。有报道^[16]称,尽管有些菌株不携带 tdh 和 trh 基因,但仍能引起严重腹泻,所以仍需加强对Vp毒力基因的监测。

Vp可分为13种热稳定O抗原群和71种热不稳定K抗原群,此外还存在许多不能被血清分型的菌株,目前O3血清型是全球大流行的优势群^[17]。本研究中92株菌株共分为11个血清型,病例源和食品源分离株的血清型别不一致,病例源的血清型别相对集中,以O3:K6和O4:Kut为主。食品源分离株血清型别相对分散,主要为O2:Kut和O5:Kut,与陈秀英等^[18]报道相似。

随着抗生素的大量使用,细菌的耐药问题日益严重。抗生素敏感试验显示,Vp对大多数受试药物敏感,对AMP的耐药率高达90.22%,部分菌株存在TET和GEN耐药性。结果与其他地区^[19]存在一定差异,可能与各地环境、抗生素使用情况不同

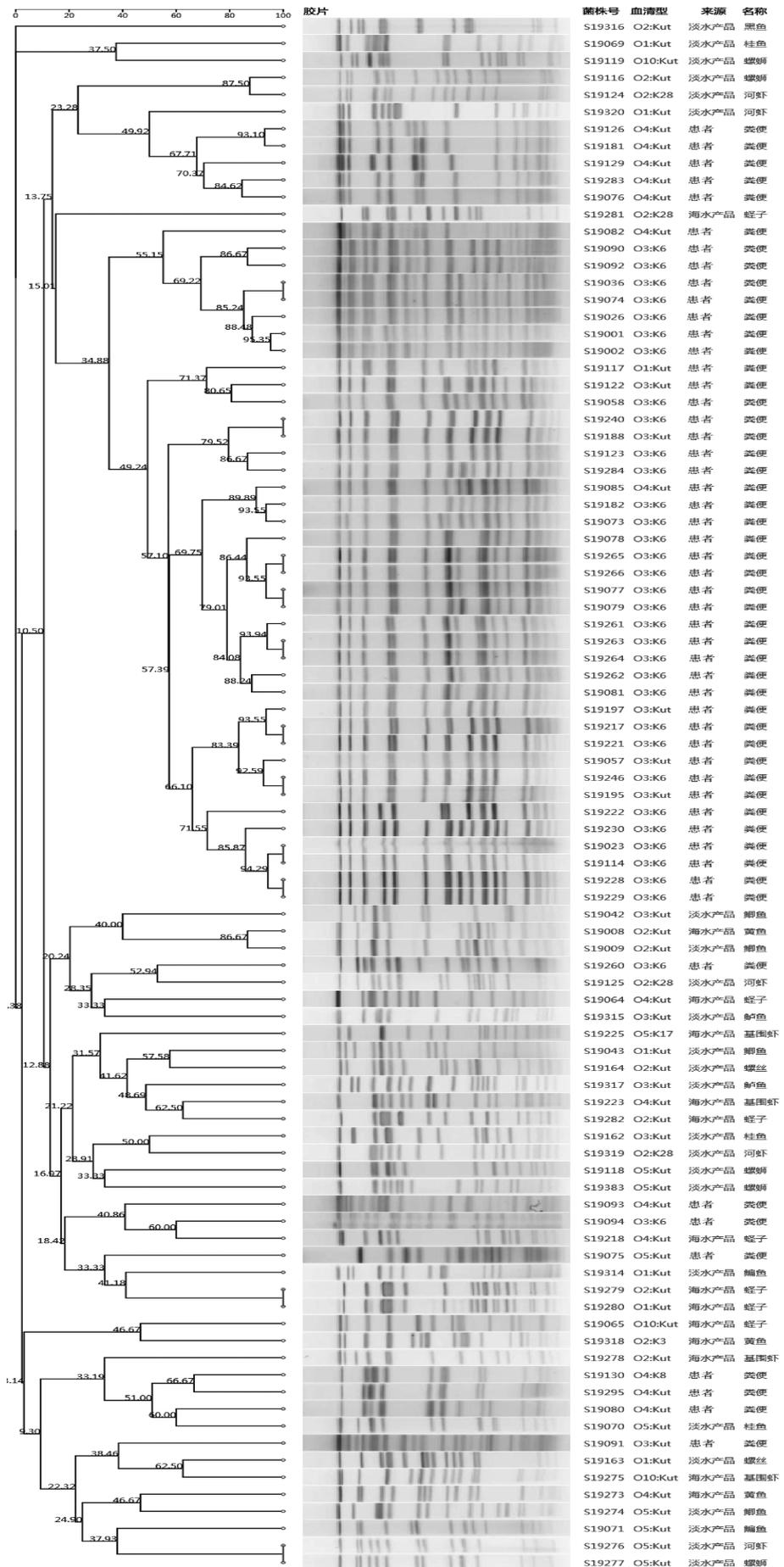


图 1 91 株 Vp 脉冲场凝胶电泳聚类分析

Figure 1 PFGE cluster analysis on 91 strains of Vp

有关。对 V_p 进行耐药监测有利于及时掌握其耐药变化趋势,方便指导临床用药。湖州水产养殖业发达,在养殖过程中使用抗生素也会影响 V_p 的耐药情况。因此,有必要对 V_p 的耐药性进行持续监测。

PFGE 能在分子层面上分析菌株之间的关系,对菌株进行溯源。通过聚类分析发现,2019 年湖州市病例源和食品源分离的菌株之间存在多态性,基因相似度不高,未发现明显的流行病学关系。按照 Tenover 判定原则,相似度大于 85.00% 的克隆系达到 16 个,其中 12 个是病例源,仅有 4 个是食品源。对比聚类图谱发现,病例源与食品源比较,其相似度更高,说明病例源流行的菌株之间关联性更为密切。同时分析还发现,病例源和食品源菌株之间最大相似度仅为 60.00%,即 S19094 和 S19218、S19080 和 S19070,提示 2019 年湖州地区食品源和病例源间 V_p 基因分型无同源性,还需后续研究。值得注意的是,一株海水产品 S19008 和一株淡水产品 S19009 之间的相似度达到 86.67%,分别采样于同一个农贸市场的不相邻摊位,推测是因为运输过程中存在淡水产品和海水产品的交叉污染。因此,相关部门还需加强监管力度,开展预警,减少 V_p 引起的食源性疾病的发生。

参考文献

- [1] MCLAUGHLIN J B, DEPAOLA A, BOPP C A, et al. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters[J]. The New England Journal of Medicine, 2005, 353 (14): 1463-1470.
- [2] LIAO Y, LI Y, WU S, et al. Risk factors for *Vibrio parahaemolyticus* infection in a southern coastal region of China[J]. Foodborne Pathogens and Diseases, 2015, 12(11): 881-886.
- [3] JOSEPH S W, COLWELL R R, KAPER J B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios[J]. CRC Critical Reviews in Microbiology, 1982, 10(1): 77-124.
- [4] 苗艳芳,崔志刚,王晓影,等. 25 株副溶血性弧菌分子流行病学特征分析[J]. 疾病监测, 2010, 25(9): 698-701.
- [5] 陈江,张荷香,廖宁波,等. 杭嘉湖地区食源性副溶血性弧菌、非伤寒沙门菌发病率的研究[J]. 中国预防医学杂志, 2018, 19(1): 49-52.
- [6] HUNTER S B, VAUTERIN P, LAMBERT-FAIR M A, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(3): 1045-1050.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验: GB 4789.7—2013[S]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [8] PARSONS M B, COOPER K L F, KUBOTA K A, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Foodborne Pathogens and Diseases, 2007, 4(3): 285-292.
- [9] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33 (9): 2233-2239.
- [10] 毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅. 2003—2007 年中国 1 060 起细菌性食源性疾病流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3): 224-228.
- [11] ZHANG H Z, SUN S F, SHI W M, et al. Serotype, virulence, and genetic traits of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Shanghai, China [J]. Foodborne Pathogens and Diseases, 2013, 10(9): 796-804.
- [12] 陈坤才,余超,李迎月,等. 水产品副溶血性弧菌污染监测结果的比较分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 509-514.
- [13] LIDA T, PARK K S, SUTHIENKUL O, et al. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiology, 1998, 144(9): 2517-2523.
- [14] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh* [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36 (3): 215-225.
- [15] 李雪,李飞,王伟杰,等. 辽宁省 2014—2016 年副溶血性弧菌毒力基因及血清型、耐药性[J]. 中国微生态学杂志, 2018, 30(2): 161-163, 184.
- [16] 陈海丽,周海健,宰淑蓓,等. 2010—2012 年上海市两家哨点医院门诊腹泻病例副溶血弧菌感染状况及菌株分子特征分析[J]. 中华预防医学杂志, 2015, 49(3): 233-236.
- [17] BAG P K, NANDI S, BHADRA R K, et al. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(7): 2354-2357.
- [18] 陈秀英,梅建华,陈沙彬,等. 2014—2018 年浙江省丽水市副溶血弧菌流行情况及菌株特征分析[J]. 疾病监测, 2019, 34 (9): 822-826.
- [19] 季雷雷,许海燕,苏婧,等. 82 株副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2018, 38 (1): 37-40.