

研究报告

2020年辽宁省副溶血性弧菌 PFGE 分型、血清型分布和耐药谱分析

李雪,孙婷婷,魏彤竹,刘海霞
(辽宁省疾病预防控制中心,辽宁沈阳 110005)

摘要:目的 了解辽宁省副溶血性弧菌(VP)的流行特征,为食源性疾病的防控提供可靠的技术支持,提高对食物中毒应急事件的处理能力。方法 对2020年从辽宁省内14个市内食源性疾病病人和食品中分离的VP进行PFGE分子分型、血清学分型、药物敏感试验并分析。结果 44株VP(食源性疾病分离株22株,食品分离株22株)共分为15个血清型,9个血清群,有8株不能进行K分型,不可分型率为18.2%。食源性疾病分离株分为4个血清型、3个血清群,主要血清群为O3,其次为O1;食品分离株分为11个血清型、6个血清群,主要血清群为O2,其次为O1和O3。44株VP对15种抗生素的药敏结果显示,头孢唑啉耐药率高达68.2%,其次是氨苄西林22.7%、红霉素13.6%、阿奇霉素4.5%、头孢西丁2.3%、头孢噻肟2.3%。菌株主要对 β -内酰胺类和大环内酯类抗生素耐药,耐药性逐年增强,一些食源性疾病分离株出现多重耐药,且多重耐药株数量逐年增加。食源性疾病分离株较食品分离株耐药率高,血清型O3:K6为主要流行菌株,且耐药率高,PFGE分子分型按相似度90%以上,可分为5种PFGE优势带型。食源性疾病分离株相似度较高,可聚类成3个组。而食品分离株相似度较低,除了两株菌相似度大于90%外,其余菌株间相似度均在85%以下。结论 O3与O1血清型菌株之间有高度同源性,提示O3与O1血清型菌株密切相关。食品分离株同源性较低,提示食品菌株间关联性较差。辽宁省2020年VP分离株耐药情况不容乐观,耐药趋势还需进一步关注。

关键词:副溶血性弧菌;脉冲场凝胶电泳;血清学分型;耐药

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)06-1166-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.06.007

PFGE typing, serotype distribution and drug resistance spectrum analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in Liaoning Province in 2020

LI Xue, SUN Tingting, WEI Tongzhu, LIU Haixia

(Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention, Liaoning Shenyang 110005, China)

Abstract: Objective To provide reliable technical support for the prevention and control of foodborne diseases and improve the ability to deal with food poisoning emergencies, the epidemic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) in Liaoning Province was studied. **Methods** The PFGE molecular typing, serological typing and drug sensitivity test of VP isolated from patients and food in 14 cities of Liaoning Province in 2020 were carried out and analyzed. **Results** Among the 44 strains of VP (22 isolates from foodborne diseases and 22 isolates from food), 8 strains could not be identified with K-type, and the untyping rate was 18.2%. The other strains were divided into 15 serotypes and 9 serogroups. The isolates from foodborne diseases were divided into 4 serotypes and 3 serogroups. The main serogroup was O3, followed by O1. Foodborne isolates were divided into 11 serotypes and 6 serogroups. The main serogroup was O2, followed by O1 and O3. The results of drug sensitivity of 44 strains of VP to 15 antibiotics showed that the resistance rate of cefazolin was 68.2%, followed by ampicillin (22.7%), erythromycin (13.6%), azithromycin (4.5%), cefoxitin (2.3%) and cefotaxime (2.3%). The main strains were resistant to β -lactam and macrolide antibiotics. Drug resistance ability increased year by year, some strains showed multiple drug resistance, and the number increased year by year. The drug resistance rate of foodborne disease isolates was higher than that of food isolates. The drug resistance rate of the main epidemic strains with serotype O3:K6 was high. PFGE molecular typing could be divided into five PFGE dominant bands according to the similarity of more than 90%. VP isolated from the patients had high similarity and could be clustered into 3 groups. The similarity of VP isolated

收稿日期:2021-12-07

基金项目:辽宁省自然科学基金(2019-ZD-1091)

作者简介:李雪 女 主任技师 研究方向为传染病和食源性致病微生物检测 E-mail:812626707@qq.com

通信作者:李雪 女 主任技师 研究方向为传染病和食源性致病微生物检测 E-mail:freeangel2000@163.com

from food was low. Except that the similarity of two strains was greater than 90%, the similarity between other strains was less than 85%. **Conclusion** There was a high homology between O3 and O1 serotype strains, suggesting that O3 and O1 serotype strains were closely related. The homology between food strains was low, suggesting low correlation. The drug resistance of VP isolates in Liaoning Province in 2020 was not optimistic, and the drug resistance trend needed further attention.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; pulsed field gel electrophoresis; serotypes; drug resistance

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一类嗜盐和嗜碱性菌,主要存在于海产品中,可引起人类急性肠胃炎和败血症^[1]。省内沿海城市例如大连、营口地区经常发生 VP 引起的食源性疾病。由于人民生活水平的提高和运输业的发展,省内非沿海城市的市场上海鲜占有率增大,VP 导致的食源性疾病已由省内沿海城市逐渐发展到非沿海城市^[2]。近年来,滥用抗生素情况严重,VP 耐药性逐年增强^[3]。有数据表明,VP 导致的食物中毒规模已远超过沙门菌,已成为一种严重的食源性致病菌^[2]。辽宁省自 2007 年以来,VP 检出率逐年增多,各市每年都有上报,尤其是大连、营口等沿海城市检出居多^[4-6]。

目前,血清分型是副溶血性弧菌分型的常用方法^[7]。通过正确的血清分型,可以了解各地区流行株的血清型。但血清分型只能大概区分不同来源、地区的 VP 菌株,且受环境等因素的影响抗原位点易发生突变,可能给食物中毒流行病学调查和溯源带来一定困难。因此,在流行病学研究方面,血清分型是受到一定限制的。目前,脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)作为分子生物学分型方法的代表,现阶段被公认为是食源性病原菌分型的金标准^[8]。PFGE 以高分辨率、高重复性等优点,广泛用于 VP 分子分型^[9]。一些发生遗传突变的 VP 菌株,PFGE 分子分型结果可能会与血清分型存在差异,可通过 PFGE 分子分型、聚类分析结果对 VP 菌株的亲缘关系做进一步探讨,从而为 VP 流行病学的调查和溯源研究提供基础^[10]。研究 VP 耐药谱,可以掌握本地地区的 VP 耐药趋势,为本地区治疗食物中毒临床合理用药提供依据^[10]。

VP 的流行性在不同地域存在较大不同,包括分子分型、血清分型及耐药谱的情况^[11]。本研究对辽宁省内 14 个市 2020 年食源性疾病患者和食品中分离得到的 44 株 VP 进行 PFGE 分子分型研究,并结合血清分型和耐药性分析,从而对省内 VP 菌株的流行趋势有更进一步的了解。

1 材料与方法

1.1 菌株

44 株菌来自 2020 年辽宁省内 14 个市的市

销售的鱼、虾、贝、螺类水产品(22 株)和食源性疾病病人的粪便(22 株)。标准菌株:沙门菌 H9812(中国疾病预防控制中心提供)、副溶血性弧菌 ATCC17802 和大肠埃希氏菌 ATCC 25922(标准菌株购买于沈阳汇佰生物有限公司)。

1.2 主要仪器与试剂

脉冲场凝胶电泳系统(型号 ChefMapper,法国梅里埃公司)、凝胶成像系统(型号 Geldoc,法国梅里埃公司)、温箱(型号 Thermo,赛默飞特尔公司)、全自动生化鉴定系统(型号 Vitek2,法国梅里埃公司)。所有仪器设备均在检定校准有效期内。

3% 氯化钠碱性蛋白胨水-3%APW(北京陆桥生物有限公司生产,批号 20210326)、3% 氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(北京陆桥生物有限公司生产,批号 20210428)、弧菌显色培养基(法国科马嘉公司生产,批号 20201228)、弧菌血清(SS1 公司生产,批号 20200113)、Not I 酶(Promega 公司生产,批号 20200806)、金胶(Bio-Rad 公司生产,批号 20201209)、gelred(Bio-Rad 公司生产,批号 20201215)、缓冲液(Promega 公司生产,批号 20191127)、药敏板试剂盒(Thermo Fisher 公司生产,批号 20201103)。所有试剂均在保质期内。

1.3 方法

1.3.1 菌株生化鉴定和血清分型

按照国标 GB4789.7—2013《食品微生物学检验副溶血性弧菌检验方法》进行^[12]。

1.3.2 耐药试验

按照 2020 年食源性疾病监测工作手册^[13]中标准和药敏板说明书操作。大肠埃希氏菌 ATCC 25922 为质控菌株。耐药谱检测包括 15 种抗生素:氨苄西林(Ampicillin, AMP)、四环素(Tetracycline, TET)、多黏菌素 E(Colistin, CT)、氯霉素(Chloramphenicol, CHL)、头孢唑林(Cefazolin, CFZ)、复方磺胺(Trimeth-sulfame, SXT)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、亚胺培南(Imipenem, IMP)、萘啶酸(Nalidixic, NAL)、头孢西丁(Cefoxitin, FOX)、头孢噻肟(Cefotaxime, FOT)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、阿奇霉素(Azithromycin, AZM)、红霉素(Erythromycin, ERY)。

1.3.3 PFGE分子分型及聚类分析

按照2020年食源性疾病监测工作手册操作。细菌悬液浓度4.5麦氏单位;Not I限制性内切酶40 U/胶块;酶切37℃ 4 h;电泳10~35 s, 19 h;胶块GelRed染色30 min,凝胶成像仪读取电泳图谱;标准菌株为沙门菌H9812。BN软件对PFGE图谱分析校准,聚类分析(非加权配对算术平均法UPGMA)和同源性研究。

2 结果

2.1 血清学分布结果

共分离44株VP,分为15个血清型,22株食源性疾病分离株分为4个血清型、3个血清群,主要血

血清群为O3,其次为O1,主要流行株为O3:K6。22株食品分离株分成11个血清型、6个血清群,主要的血清群为O2,其次为O1和O3群。食源性疾病分离株和食品分离株中,O1和O3都是主要流行血清群。另有8株食品株不能进行K分型,不可分型率为18.2%。见表1。

2.2 PFGE分子分型及BN软件分析结果

按相似度90%以上聚类分析,45株菌(包括1株ATCC17802)分为5种PFGE优势带型,设为A-E组基因型,相似度为90%~100%。A组包含9株菌,B组包含6株菌,C组包含4株菌,D组包含2株菌,E组包含2株菌,其他22株菌株带型分散,为非优势带型。见图1。

表1 44株VP血清型结果

Table 1 Serotypes of 44 *Vibrio parahaemolyticus*

食源性疾病菌株血清型	数量/株	食品菌株血清型	数量/株	食品菌株血清型	数量/株	食品菌株血清型	数量/株
O3:K6	12	O2:K28	3	O1:K33	1	O3:K45	2
O1:K5	6	O2:K3	1	O1:K19	1	O3:K6	1
O4:K8	2	O2(K不能分型)	8	O1:K32	1	O5:K17	1
O3:K29	2			O4:K42	1	O10:K24	1
				O4:K34	1		

表2 44株VP耐药谱

Table 2 Resistance spectrum of 44 *Vibrio parahaemolyticus*

耐药谱	耐药/株	耐药率/%	食源性疾病/株	食品株/株	来源
CFZ	30	68.2	22	8	
AMP	10	22.7	8	2	活海螺(6)鲜鲑鱼(2)
ERY	6	13.6	5	1	活海螺(2)
AZM	2	4.5	2	0	活海螺(1)
FOX	1	2.3	1	0	
FOT	1	2.3	1	0	
FOX-AMP-CFZ	1	2.3	1	0	
FOX-AMP-CFZ-FOT	1	2.3	1	0	
AMP-CFZ-ERY	3	6.8	3	0	
FOX-AMP-CFZ-ERY	3	6.8	3	0	

2.3 15种抗生素耐药谱结果

耐药结果显示,对15种抗生素总体耐药株总计达30株,耐药株占比68.2%。2018和2019年耐药株占比52.6%和56.3%^[2],因此2020年耐药株占比较前两年增多。食源性疾病分离株耐药率为81.8%,食品分离株耐药率为36.4%,食源性疾病株耐药率远高于食品株。而血清型O3:K6菌株一共有13株,全部耐药。见表2。

3 讨论

3.1 血清分型

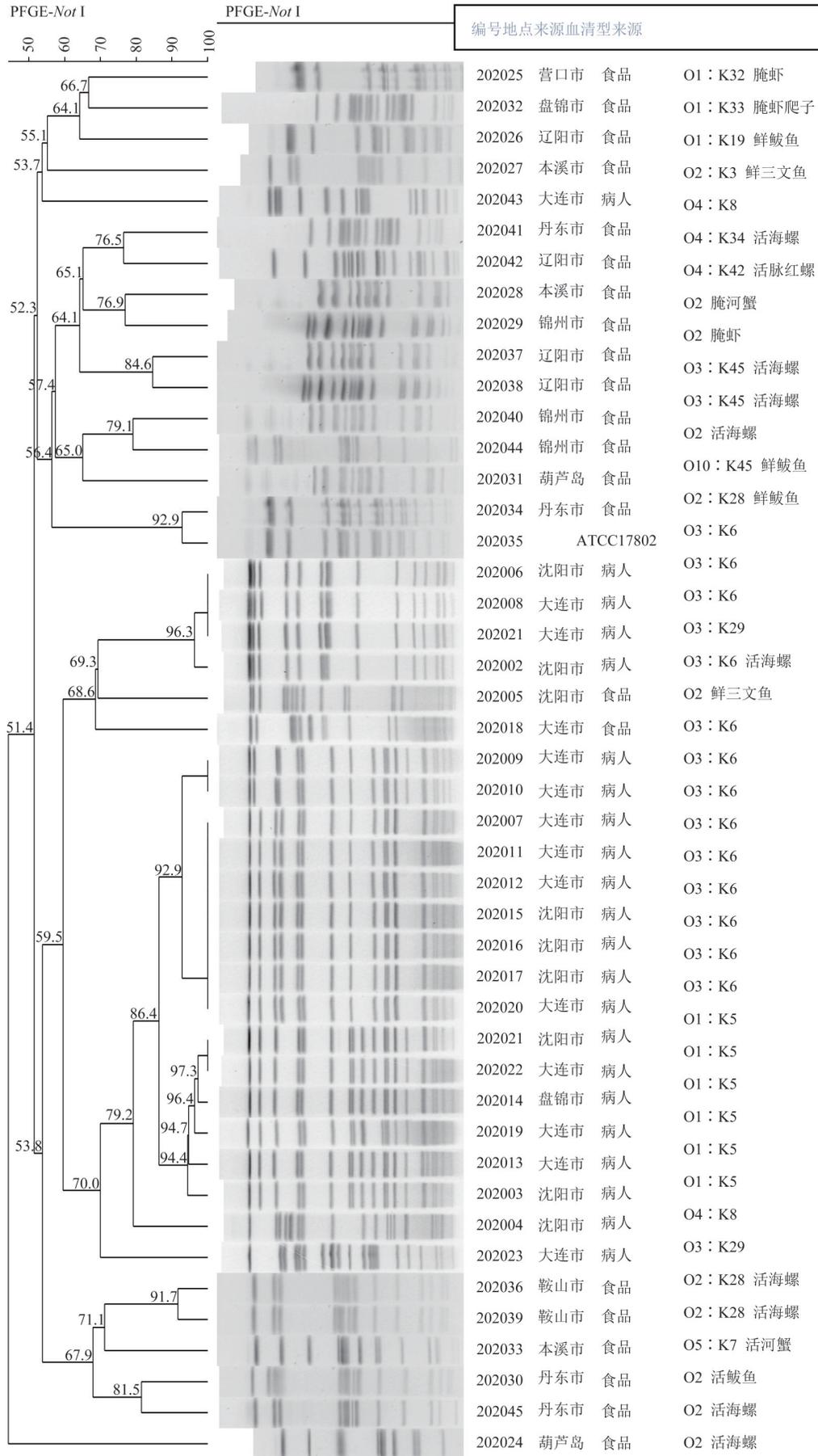
VP血清现阶段有13个O群和71个K型,本研究中2020年44株菌中有8株不能够进行K抗原分型,而这8株全部来源于食品分离菌,提示食品分离株血清分型更难区分,且食品分离株血清型

非常分散。食源性疾病分离株血清型较集中。按地域来看,省内各市菌株血清型分布分散,提示血清分型地域流行特征不明显。

3.2 PFGE分型和溯源分析

食源性疾病分离株PFGE分型聚类后,按相似度>90%分成3组优势带型,分别为A组、B组和C组。A组菌株血清型均是O3:K6,B组菌株血清型均是O1:K5,而A组和B组相似度为86.4%,因此,血清型O3:K6的菌株与血清型O1:K5的菌株亲缘关系近,提示血清群O3和O1密切相关。而食源性疾病分离株血清型较集中,聚类分析相似度较高,因此推断食源性疾病菌株多为表型和遗传相关菌株。

食品菌株血清型较分散,而PFGE分型结果也提示分子分型很分散,除D组和E组个别菌株相似度之外,其他菌株相似度均不高,血清分型分散,



注:食源性疾病菌株均来源于病人粪便,食品株分离自省内各市菜市场的海鲜食品

图 1 45 株副溶血性弧菌 PFGE 分型图谱聚类分析

Figure 1 Cluster analysis of PFGE typing map of 45 *Vibrio parahaemolyticus*

食品菌株血清型和 PFGE 分型结果基本一致,提示食品分离株多是表型和遗传不相关菌株。

20 世纪 80 年代,我国食源性 VP 血清型主要以 O1、O4 群为主^[2]。近几年,辽宁省内食源性 VP 的血清型主要以 O3 和 O1 群为主,与国外一些国家及国内其他省份检出的食源性 VP 血清型流行情况相似,流行血清型由 O4 转变为 O3,这可能与食品株在食源性疾病患者的自然选择演变有关。2015—2020 年 PFGE 分型结果均显示 O3 与 O1 相似度高^[2],因此推断 O3 群很可能来源于 O1 群菌株。

3.3 药敏结果分析

2020 年菌株主要对 β -内酰胺类和大环内酯类抗生素产生耐药,且耐药性逐年增强。一些菌株出现多重耐药且数量逐年增加。食源性疾病分离株耐药率要远高于食品分离株,且血清型为 O3:K6 的临床主要流行菌株更易产生耐药性,提示经过食源性疾病患者自然选择后的 VP 菌株型更易产生耐药,这可能与近些年来对患者滥用抗生素有关。

食源性疾病分离株中,耐药菌株基本都在 A 组、B 组和 C 组基因型中,多重耐药株均出现在 A 组基因型中,提示食源性疾病菌株中耐药菌株同源性高,亲缘关系近。根据辽宁省近几年 VP 耐药监测结果,头孢唑啉、氨苄西林、红霉素耐药率显著增高。少数菌株出现三重、四重多重耐药,且多重耐药菌率逐年增加。近几年耐药性致病菌的占比增多,提示我们更应该重视研究菌株的耐药谱,特别是治疗食物中毒病例,应根据相应的耐药结果合理临床用药^[7]。辽宁省 2020 年 VP 耐药情况和耐药趋势还需给予更多关注。

本研究通过对 2020 年辽宁省内 14 个市的 44 株 VP 进行 PFGE 分子分型,并结合血清分型、耐药性研究和 PFGE 分子分型对 VP 菌株进行溯源研究。在对食物中毒事件调查中,可以溯源找出问题食物,查明污染源,及时采取有效措施,控制事件的进一步发展;确定临床各病例与食品之间的关系,为流行病学研究和疾病预防控制提供依据。同时根据药敏实验结果,指导本地区临床合理用药。

参考文献

[1] 阙凤霞,叶玉龙,杨博雯,等.上海市金山区 2017 年—2018 年水产品中副溶血性弧菌病原学特征分析[J].中国卫生检验杂志,2020,30(16):1964-1966.
QUE F X, YE Y L, YANG B W, et al. Analysis of pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* colonized in aquatic products from Jinshan district, Shanghai during 2017 to 2018 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2020, 30(16): 1964-1966.

[2] 李雪,张眉眉,马景宏,等.辽宁省食源性副溶血性弧菌 PFGE 分子分型及血清型、耐药谱[J].中国微生态学杂志,2017,29(11):1269-1271,1304.
LI X, ZHANG M M, MA J H, et al. PFGE typing, serotype and drug resistance spectrum of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Liaoning province [J]. Chinese Journal of Microecology, 2017, 29(11): 1269-1271, 1304.

[3] 李雪,张眉眉,张铭琰,等.辽宁省溶藻弧菌 REP-PCR 和 PFGE 分子分型、耐药谱的研究[J].中国微生态学杂志,2018,30(5):535-540.
LI X, ZHANG M M, ZHANG M Y, et al. REP-PCR, PFGE molecular typing and drug resistance spectrum research for *Vibrio alginolyticus* [J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(5): 535-540.

[4] 李雪,张眉眉,马景宏,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.
LI X, ZHANG M M, MA J H, et al. Virulence genes, serotypes and drug resistance of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Liaoning during 2014 to 2016 [J]. Chinese Journal of Microecology, 2018, 30(2): 161-163, 184.

[5] CHAO G X, JIAO X N, ZHOU X H, et al. Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China [J]. Food Control, 2009, 20(10): 907-912.

[6] WENG X, ZHANG C, JIANG H. Advances in microfluidic nanobiosensors for the detection of foodborne pathogens [J]. LWT, 2021, 151: 112172.

[7] ZHANG M M, LIU J F, SHEN Z Q, et al. A newly developed paper embedded microchip based on LAMP for rapid multiple detections of foodborne pathogens [J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 197.

[8] CHANG M X, ZHANG J F, SUN Y H, et al. Contribution of different mechanisms to ciprofloxacin resistance in *Salmonella* spp. [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 663731.

[9] SHENG L N, ZHU M J. Practical in-storage interventions to control foodborne pathogens on fresh produce [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(5): 4584-4611.

[10] 许金凤,曹文婷,张潇丹,等.镇江地区 2018 年不同来源副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J].临床检验杂志,2020,38(1):70-72.
XU J F, CAO W T, ZHANG X D, et al. Analysis of virulence genes and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Zhenjiang in 2018 [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2020, 38(1): 70-72.

[11] 王霄晔,任婧寰,王哲,等.2017 年全国食物中毒事件流行特征分析[J].疾病监测,2018,33(5):359-364.
WANG X Y, REN J H, WANG Z, et al. Epidemiological characteristics of food poisoning events in China, 2017 [J]. Disease Surveillance, 2018, 33(5): 359-364.

[12] 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,2014.

National Health and Family Planning Commission. Food safety national standard-Microbiological examination of food hygiene-Examination of *Vibrio parahaemolyticus*: GB 4789.7—2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.

[13] 国家食品安全风险评估中心. 2020食品安全风险监测手册V(202203)1.0[Z]. 2022.

China National Center for Food Safety Risk Assessment. 2020 Food Safety Risk Monitoring Manual V(202203)1.0[Z]. 2022.

国民营养健康指导委员会办公室关于征求成人高脂血症食养指南等系列指南(征求意见稿)意见的函

国卫食品营便函〔2022〕211号

各有关单位:

为贯彻落实《健康中国行动(2019—2030年)》《国民营养计划(2017—2030年)》,发展传统食养服务,发挥食药物质、新食品原料等营养健康作用,有效防控我国人群主要慢性疾病的发生发展,提升居民营养健康素养,我办组织起草了《成人高脂血症食养指南(征求意见稿)》等系列指南。现向社会公开征求意见,请于12月9日前将反馈意见按意见反馈表格式一并反馈我办。逾期不反馈,将视为无不同意见。

感谢支持!

联系人:郝丽鑫、徐娇

联系电话:010-68791473、68791474(传真)

邮箱:spyyc@nhc.gov.cn

- 附件:1.成人高脂血症食养指南(征求意见稿)
2.成人高血压食养指南(征求意见稿)
3.儿童青少年生长迟缓食养指南(征求意见稿)
4.成人糖尿病食养指南(征求意见稿)
5.意见反馈表

国民营养健康指导委员会办公室

2022年11月21日

(信息公开形式:主动公开)

食品安全标准与监测评估司

二〇二二年十一月二十九日

(相关链接:<http://www.nhc.gov.cn/sps/s7887k/202211/60710be5069644938eea89e5c3b442f0.shtml>)