

食源性疾病

一起由副溶血性弧菌引起的聚集性腹泻事件的病原特征分析

吴晓芳¹, 陈莉萍¹, 沈月华¹, 严伟¹, 纪蕾¹, 许向东²

(1. 湖州市疾病预防控制中心, 浙江 湖州 313000; 2. 南浔区疾病预防控制中心, 浙江 湖州 313009)

摘要:目的 对2021年湖州市南浔区一起聚集性腹泻事件分离的副溶血性弧菌进行病原特征分析, 为及时采取控制措施提供依据。方法 通过询问患者、医院核查等方法搜索到疑似病例59例, 对采集的29份厨师、服务员和病例的肛拭子标本以及18份留存餐食进行病原学检测, 采用血清学鉴定、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多重荧光聚合酶链式反应和微量肉汤稀释法分别对副溶血性弧菌分离株进行血清分型、分子分型、*tlh*/*tdh*/*trh* 毒力基因检测和药敏试验。结果 从3份厨师和6例病例的肛拭子标本中分离到副溶血性弧菌, 检出率为15.25%; 分离株血清型均为O10:K4。所有菌株*tlh*、*tdh*基因均为阳性, *trh*基因均为阴性。9株分离株仅对氨苄西林耐药, 对其他12种抗生素均敏感。经PFGE聚类分析, 菌株间相似系数为100.0%, 厨师分离株和病例分离株带型一致。结论 这是一起由O10:K4副溶血性弧菌引起的聚集性腹泻事件, 分离株均携带*tdh*毒力基因, 分离株之间的同源性高。

关键词:副溶血性弧菌; 聚集性腹泻事件; 毒力基因; 抗生素耐药; 血清型O10:K4

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)05-0768-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.05.022

**Analysis of the pathogenic characteristics of a clustered diarrhea event caused by
*Vibrio parahaemolyticus***

WU Xiaofang¹, CHEN Liping¹, SHEN Yuehua¹, YAN Wei¹, JI Lei¹, XU Xiangdong²(1. Center for Disease Control and Prevention of Huzhou City, Zhejiang Huzhou 313000, China;
2. Center for Disease Control and Prevention of Nanxun District, Zhejiang Huzhou 313009, China)

Abstract: Objective To provide evidence for timely control measures, the pathogenic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from a cluster diarrhea event in Nanxun District, Huzhou City, in 2021 were analyzed. **Methods** Fifty-nine suspected cases were identified by interviewing patients and checking hospitals. Twenty-nine anal swab samples were tested for etiology from cooks, waiters, and patients, and 18 food leftovers. Serotyping, molecular typing, *tlh*/*tdh*/*trh* virulence gene detection, and drug sensitivity testing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates were performed by serological identification, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multiplex fluorescent polymerase chain reaction, and micro-broth dilution methods, respectively. **Results** *Vibrio parahaemolyticus* was isolated from anal swab samples of 3 cooks and 6 cases, and the detection rate was 15.79%. The serotype of the isolates was O10:K4. All strains were positive for *tlh* and *tdh* and negative for *trh*. Nine isolates were only resistant to ampicillin and sensitive to the other 12 tested antibiotics. PFGE clustering analysis revealed a 100% similarity coefficient between isolates. The band type of isolates from cooks and patients was consistent. **Conclusion** The aggregation diarrhea was caused by *Vibrio parahaemolyticus* O10:K4. All isolates harbored the *tdh* virulence gene. Homology among the isolates was high.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; cluster diarrhea event; virulence genes; drug resistance; serotype O10:K4

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是沿海地区引起食物中毒最常见的食源性致病菌^[1]。国家食源性疾病监测数据显示,我国食源性疾病暴发事件主要以副溶血性弧菌、沙门菌和金黄色葡萄球菌为主^[2]。近年来,浙江省湖州市在食源性疾病

主动监测腹泻病例中,副溶血性弧菌的检出率仅次于致泻性大肠埃希菌^[3]。食品安全风险监测发现,淡水、海水产品受到副溶血性弧菌不同程度的污染^[4]。2021年8月,湖州市南浔区某医院接到报告有多例以腹泻症状为主的患者就诊,南浔区疾病预防控制中心迅速赴现场开展处置工作,最后经多重荧光聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测携带的毒力基因、脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)对分离菌株进行溯源

收稿日期:2021-12-28

作者简介:吴晓芳 女 主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail:xf980718@126.com

分析,同时结合流行病学调查结果,通过对该起由副溶血性弧菌引起的聚集性腹泻事件的病原特征分析,为有效控制食源性疾病的发生提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

共采集各类样品 47 份,其中酒店当日留存餐食 18 份,厨师和服务员肛拭子 19 份,病例肛拭子 10 份,检测项目为副溶血性弧菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌和致泻性大肠埃希菌。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK MS 飞行质谱仪(法国梅里埃),ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国),Sensititre Vizion 全自动药敏试验菌液接种判读仪(Thermo 公司),PFGE 仪(CHEF Mapper XA),凝胶成像仪(美国 Bio-Rad)。

弧菌显色培养基和沙门菌显色培养基(法国 CHR OMagar),副溶血性弧菌 O 及 K 诊断血清(日本生研),副溶血性弧菌(TRH、TDH、TLH)三重核酸检测预分装试剂盒(荧光 PCR 法)(深圳生科原),96 孔药敏板(Thermo fisher),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)。以上试剂均在有效期内使用。参考菌株为沙门菌标准菌株 H9812,由浙江省疾病预防控制中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 致病菌检测

食品检测按照 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》^[5]进行分离培养;腹泻患者和厨师肛拭子标本按照 WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[6]和《2021 年国家食源性疾病监测工作手册》进行检测。将标本直接分离到弧菌显色平板、哥伦比亚血平板、沙门显色平板、XLD 平板和麦康凯平板;同时进行增菌后分离培养,分别挑取平板上可疑菌落进行纯培养后再进行质谱鉴定、血清学分型。

1.2.2 毒力基因检测

用加热煮沸方法提取副溶血性弧菌 DNA,按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行副溶血性弧菌 *tlh*/*tdh*/*trh* 毒力基因检测。

1.2.3 药敏试验

采用微量肉汤稀释法,将配制好的菌悬液 10 μ L 加入到肉汤培养基的试管内,然后取 50 μ L 肉汤菌悬液至革兰氏阴性菌药敏板微孔中进行检测,结果判读参照《2021 年国家食源性疾病监测工作手册》。

1.2.4 PFGE 分子分型

参照《2021 年国家食源性疾病监测工作手册》进行检测。限制性内切酶为 *Not* I,并以 H9812 沙门菌作为标准菌株。电泳条件参照手册中副溶血性弧菌 PFGE 标准操作方法进行,电泳结束后经 Gel Red 染色成像,并使用 Bionumerics 分析软件进行聚类分析。

2 结果

2.1 腹泻患者基本情况

2021 年 8 月 1 日,湖州市南浔区某酒店举办婚宴,晚餐于 17:30 开始,持续至 20:00 左右。约 2 h 后陆续有人发病,临床症状为以腹泻、腹痛为主。腹泻大多为水样便,腹泻次数 3~15 次不等,无重症及死亡病例。59 例病例中,其中男性 24 人,女性 35 人,男女性别比 1:1.46。年龄最小者 11 岁,最大 85 岁,发病人群集中在 31~70 岁。

2.2 致病菌检测结果

18 份留存餐食(包括 3 份冷菜和 15 份热菜)、19 份厨师和服务员肛拭子(其中 6 个厨师炒菜、3 个厨师配菜、10 名服务员)、10 例病例肛拭子共 47 份样品,纯培养后经质谱鉴定分析,3 份厨师肛拭子和 6 例病例肛拭子标本中检出副溶血性弧菌,血清型试验结果均为 O10:K4 血清型。所有样品经增菌、分离培养后均未检出沙门菌、致泻性大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌。

2.3 毒力基因和药敏检测结果

9 株副溶血性弧菌分离株 *tlh* 和 *tdh* 毒力基因均呈阳性,*trh* 均呈阴性。9 株分离株对氨苄西林 100% 耐药,对氨苄西林/舒巴坦、头孢噻肟、头孢他啶、四环素、环丙沙星、阿奇霉素、茶啶酸、氯霉素、庆大霉素、亚胺培南、阿米卡星、链霉素 12 种抗生素均敏感。

2.4 PFGE 聚类分析结果

对 PFGE 图谱聚类分析,6 例病例和 3 份厨师的肛拭子标本分离株具有完全相同的 PFGE 带型,同源性达到 100%,见图 1。

3 讨论

在我国食源性疾病暴发事件中,由微生物因素所致的发病人数最多,其中副溶血性弧菌所致事件起数最多^[7]。浙江省由副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发事件数和病例数最高^[8]。据统计,2002—2018 年湖州地区发生的细菌性食源性疾病事件主要由副溶血性弧菌引起。近年来湖州地区散发腹泻病例中也以副溶血性弧菌为主,血清型别主要以

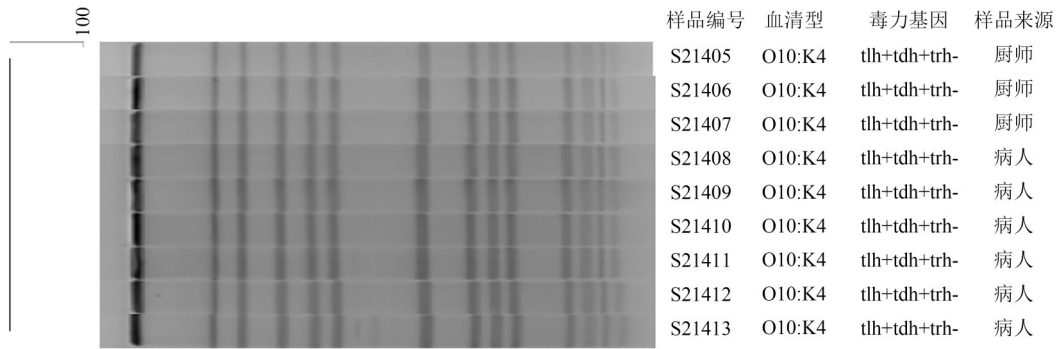


图1 9株副溶血性弧菌PFGE聚类分析图谱

Figure 1 Clustering analysis of PFGE patterns of 9 strains of *Vibrio parahaemolyticus*

O3:K6 和 O4:KUT 为主^[3-4]。本次聚集性腹泻事件从 3 名厨师和 6 名病例肛拭子中分离到副溶血性弧菌,其他参加酒宴的人员在出现腹泻症状后自行服用药物,导致未能分离到副溶血性弧菌。而 3 名厨师腹泻症状较轻,没有就医也没有自行服药。分离的 9 株副溶血性弧菌血清型均为 O10:K4,这与湖州地区 2021 年食源性散发腹泻病例中血清型流行趋势一致。

自 2021 年 5 月以来,O10:K4 副溶血性弧菌在湖州地区散发腹泻病例中首次出现且逐渐成为流行优势株。据统计,2021 年湖州地区散发腹泻病例中 O10:K4 血清型占 81.82%。研究发现,遗传关系密切的副溶血性弧菌可能表现出不同的血清型^[9]。据报道,非 O3:K6 血清型可能起源于 O3:K6^[10]。通过荚膜 K 抗原和体细胞 O 抗原编码基因的突变或基因水平转移来改变血清型可能是副溶血性弧菌适应环境变化和人类免疫反应的一种方式^[11]。本研究由 O10:K4 副溶血性弧菌引起的聚集性腹泻事件在国内外首次报道。本文结果表明,O10:K4 湖州株与 O3:K6 菌株在遗传学上非常接近,O10:K4 湖州株可能来源于湖州原来流行的 O3:K6 菌株。新血清型不断出现背后的机制以及不同血清型之间的关系还需要进一步研究。

副溶血性弧菌可以产生耐热直接溶血素(Thermotolerant direct hemolysin, TDH)、耐热直接相关溶血素(Thermotolerant directly related hemolysin, TRH)和不耐热直接溶血素(Thermolabile hemolysin, TLH),致病性主要和能否产生 TDH 和 TRH 等致病因子有关^[12],临床分离株中普遍携带 *tdh* 基因^[13]。本次事件分离的 9 株副溶血性弧菌分离株 *tdh* 毒力基因均阳性,*trh* 均阴性,说明这 9 株副溶血性弧菌对人体均有致病性。

PFGE 是目前大多数细菌分子分型的金标准^[14],分辨率高及重现性好,已被广泛应用于食源性疾病病原菌的分子流行病学调查和溯源分析^[15]。

通过对分离菌株的 PFGE 分子分型,有助于发现副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发,从而及时控制食源性疾病的发生。本文 PFGE 结果显示,9 株分离株的电泳条带完全相同,提示病例株和厨师分离株具有高度的同源性,不排除厨师是本次聚集性腹泻事件传染源的可能。由于酒店酒席当日晚餐供应的鲍鱼、龙虾、珍宝蟹等多种海产品均未留样,现场未能采集到相关食物样品,因此不能判断本次事件的主要病因食品。

药物敏感试验结果表明,所有菌株对氨苄西林 100% 的耐药,对氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、头孢噻肟等其他 12 种药物均敏感,与报道结果基本一致^[16-17]。2021 年随机选取散发腹泻病例中 O10:K4 副溶血性弧菌分离株进行药敏试验,结果显示对氨苄西林的耐药率达到 86.96%。湖州地处典型的水网地带,鱼塘养殖业异常发达,可能由于水产品养殖过程中没有规范、合理使用抗菌药物从而导致耐药。

副溶血性弧菌是引起食源性疾病的重要病原菌,并具有多种血清型,不同的血清型在近几年水产品、散发腹泻标本和聚集性腹泻疫情中都有检出^[3-4,18]。因此及时监测食源性腹泻病例中副溶血性弧菌感染状况以及不同血清型的变化情况,为提高食源性疾病的早期识别、预警与防控能力,预防食源性疾病的发生提供科学依据。同时相关部门应加强对餐饮宴席等重点领域的日常监管,按要求做好食品的留样;规范食品制作流程,严格生熟分开,避免交叉污染;强化食品安全知识的宣传培训,提高从业人员的食品安全意识,减少食源性疾病的发生。

参考文献

- [1] 任淑敏, 张良军, 刘凡, 等. 一起由副溶血性弧菌引起的食源性疾病的病原学研究及溯源分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 741-745.

- REN S M, ZHANG L J, LIU F, et al. Etiological survey and traceability analysis of a case of foodborne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(4): 741-745.
- [2] 申海鹏. 我国食源性疾病监测现状[J]. 食品安全导刊, 2015 (13): 46-48.
- SHEN H P. Current situation of foodborne disease surveillance in China[J]. China Food Safety Magazine, 2015(13): 46-48.
- [3] 吴晓芳, 徐德顺, 纪蕾, 等. 2018—2020年浙江省湖州市食源性疾病监测结果分析[J]. 疾病监测, 2021, 36(9): 958-962.
- WU X F, XU D S, JI L, et al. Surveillance results of foodborne diseases in Huzhou, Zhejiang, 2018—2020 [J]. Disease Surveillance, 2021, 36(9): 958-962.
- [4] 严伟, 沈月华, 徐德顺. 2019年浙江省湖州市副溶血性弧菌病原学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(1): 74-78.
- YAN W, SHEN Y H, XU D S. Etiologic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* stains in Huzhou of Zhejiang in 2019 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(1): 74-78.
- [5] 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. National food safety standard-Microbiological examination of food hygiene - Examination of *Vibrio parahaemolyticus*: GB 4789.7—2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 感染性腹泻诊断标准: WS 271—2007[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. Diagnostic criteria for infections diarrhea: WS 271—2007 [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.
- [7] 付萍, 王连森, 陈江, 等. 2015年中国大陆食源性疾病暴发事件监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 64-70.
- FU P, WANG L S, CHEN J, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China mainland in 2015 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(1): 64-70.
- [8] 孙亮, 陈莉莉, 廖宁波, 等. 2006年—2017年浙江省食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(15): 1874-1877.
- SUN L, CHEN L L, LIAO N B, et al. Analysis of foodborne disease outbreak surveillance data in Zhejiang province, 2006—2017 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2019, 29(15): 1874-1877.
- [9] ZHAO L, CHEN H Y, DIDELOT X, et al. Co-existence of multiple distinct lineages in *Vibrio parahaemolyticus* serotype O4: K12[J]. Microbial Genomics, 2020, 6(12): mgen000287.
- [10] VELAZQUEZ-ROMAN J, LEÓN-SICAÍROS N, FLORES-VILLASEÑOR H, et al. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(6): 1794-1803.
- [11] MAHMUD Z H, NEOGI S B, KASSU A, et al. Seaweeds as a reservoir for diverse *Vibrio parahaemolyticus* populations in Japan [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 118(1): 92-96.
- [12] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 749-754.
- WANG X R. Preventive medicine microbiology and laboratory techniques [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 749-754.
- [13] 张冲, 高翔, 甄博珺, 等. 副溶血弧菌 PFGE 分型、毒力基因及其耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4): 1015-1018, 1021.
- ZHANG C, GAO X, ZHEN B J, et al. Analysis of PFGE molecular typing, toxin genes and antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 23(4): 1015-1018, 1021.
- [14] ALAM M, CHOWDHURY W B, BHUIYAN N A, et al. Serogroup, virulence, and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6268-6274.
- [15] WANG N, YANG L, ZHANG H X, et al. microRNA-9a-5p alleviates ischemia injury after focal cerebral ischemia of the rat by targeting ATG5-mediated autophagy [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 45(1): 78-87.
- [16] 张晶, 王安娜, 陶霞, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒分离株的特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(3): 256-259.
- ZHANG J, WANG A N, TAO X, et al. Etiological analysis of a small outbreak of gastroenteritis with *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(3): 256-259.
- [17] 强鑫华, 蔡云祥. 食源性腹泻患者分离副溶血性弧菌毒力基因及药敏分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(2): 155-158.
- QIANG X H, CAI Y X. Virulence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* in patients with foodborne diarrhea [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2021, 31(2): 155-158.
- [18] 杨丽萍. 浙江省湖州市南浔区一起农村婚宴引起的副溶血性弧菌食物中毒调查分析[J]. 疾病监测, 2014, 29(2): 154-155.
- YANG L P. Survey of a *Vibrio parahaemolyticus* poisoning event after wedding feast in rural area in Huzhou of Zhejiang, China [J]. Disease Surveillance, 2014, 29(2): 154-155.