

论著

副溶血性弧菌食源性疾病暴发分离株的血清型、核糖型及毒力基因研究

陈洪友,陈敏,盛跃颖,屠丽红,张雯霞,张曦,王文静  
(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

**摘要:**目的 了解目前食源性副溶血性弧菌暴发菌株在上海地区的血清型分布、毒力相关基因的携带情况,及 Ribo 分型。方法 收集上海市 27 起食源性副溶血性弧菌暴发事件分离的 98 株副溶血性弧菌,采用副溶血性弧菌分型血清对所收集的菌株进行血清学分型。利用双重 PCR 方法扩增 *tdh*、*trh* 两个重要的毒力基因以了解其毒力基因的携带情况。应用 Riboprinter 系统检测上述菌株的酶切片段杂交多态性。结果 引起 27 起暴发的 98 株副溶血性弧菌分为 11 个血清型,5 个 Ribo 型。优势血清型为 O3:K6,优势 Ribo 型为 vp-EcorI-002 型。全部分离菌株均携带 *toxR* 基因,97 株携带 *tdh* 基因,1 株携带 *trh* 基因。有多起暴发事件分离到多个血清型的副溶血性弧菌。结论 血清分型和 PCR 方法检测毒力基因,是副溶血性弧菌暴发事件实验室诊断的有用方法。对于从一起暴发事件中检出的不同血清型的副溶血性弧菌需要确认各菌株与暴发的关系。

**关键词:**副溶血性弧菌;食源性疾病暴发;核糖分型;血清分型

中图分类号:R378.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0114-05

**Distribution of serotype, ribotype and virulence gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from foodborne disease outbreaks**

Chen Hongyou, Chen Min, Sheng Yueying, Tu Lihong, Zhang Wenxia, Zhang Xi, Wang Wenjing  
(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

**Abstract: Objective** To find out the distribution of serotype and virulence genes in the *Vibrio parahaemolyticus* isolated from foodborne disease outbreaks and also the main ribotype of these strains. **Methods** Ninety eight *Vibrio parahaemolyticus* strains were isolated from the patients of monitoring points in 27 foodborne disease outbreaks. Diplex-PCR was used to detect *tdh* and *trh* gene. Ribotyping was carried out in the Riboprinter system. **Results** The isolates from 27 outbreak points were distributed in 11 serotypes and 5 ribotypes. The dominant serotype was O3:K6, and the main ribotype was vp-EcorI-002. All strains carried *toxR* gene, 97 strains carried *tdh* gene and only 1 strain carried *trh* gene. **Conclusion** Most strains in the study were pandemic and toxigenic, and a closer evolution relationship was observed between serotype O3:K6 and serotype O5:K68,O1:K25 and O11:K36.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; foodborne disease outbreak; ribotyping; serotyping

副溶血性弧菌广泛分布于海水和海产品中,是引起食源性疾病暴发的重要病原菌之一。我国沿海城市副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发在全部食源性疾病暴发中已占首位,部分地区已占到 60% 左右。近几年副溶血性弧菌的研究重点则集中在抗原分析、毒力基因 (*tdh*、*trh*) 和特异性基因 (*toxR*、*pR72H*) 检测方面,并已建立了相应的检测方法<sup>[1]</sup>,包括显色培养基、实时荧光 PCR 等。这些方法的应用使副溶血性弧菌的检测相较以前更加快捷、准确。本研究分析了 2006 年上海市食源性疾

暴发监测区县分离的副溶血性弧菌主要血清型别的 Ribo 分型特点、毒力特点,为分析此菌的流行特征提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

所有菌株均为上海市 2006 年食源性疾病暴发监测区/县(宝山区、崇明县、奉贤区、静安区、金山区、卢湾区、闵行区、南汇区、浦东区)分离的副溶血性弧菌,涉及 27 起暴发事件,共收集 98 株,其中 1 株来自食物中毒环节样,97 株来自暴发患者的肛拭样本,可疑食品中未分离到副溶血性弧菌。所有菌株均经生化试验和嗜盐试验确认。

1.2 试剂

生化试验鉴定试剂条为 API 20E(生物梅里埃,

收稿日期:2010-06-28

基金项目:“十一五”科技重大专项(2008ZX10004-002)

作者简介:陈洪友 男 公卫医师 研究方向为致病性弧菌与食源性感染研究 E-mail:hychen@scdc.sh.cn

通信作者:陈敏 男 副主任技师

法国),副溶血性弧菌分型用免疫血清(O群别和K型别)(生研,日本,批号:212344),核糖分型用限制性内切酶、电泳凝胶、杂交探针、杂交缓冲液(杜邦,美国),PCR引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 血清分型

副溶血性弧菌血清分型采用玻片凝集法<sup>[2]</sup>。

#### 1.3.2 PCR检测

参考Kim等<sup>[3]</sup>设计的种特异性引物,以编码毒素表达调控蛋白基因(*toxR*)的为目标序列,目的产物为368 bp。耐热直接溶血素基因(*tdh*)和耐热相关溶血素(*trh*)的检测,使用Bej等<sup>[4]</sup>设计的双重PCR引物,目的产物分别为270和486 bp。核酸抽提采用热裂解法,PCR反应体系和条件分别参考Kim和Bej的报道,产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳30 min,EB染色后紫外拍照。

#### 1.3.3 核糖分型及分析

细菌划线接种羊血琼脂平板,37℃过夜培养,粘取单个菌落配成菌悬液,转移至Riboprinter微生物鉴定系统,核糖分型(Ribo分型)由Riboprinter微生物鉴定系统自动完成。限制性内切酶采用*EcoR* I。杂交图谱在Bionumerics 6.0软件中采用UPGMA法进行聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 血清分型

血清分型显示,所有与疾病暴发相关的98株副溶血性弧菌分布于11个不同的血清型,其中22起暴发分离菌株为单一血清型,有5起暴发分离到不同血清型的菌株,见表1。O3:K6血清型最为常见,其次为O4:K8、O1:K25、O5:K68和O1:K41。O3:K6型副溶血性弧菌是引起食源性疾病暴发的最主要的血清型,该血清型取代了1996年之前的最为普遍的O4:K8血清型成为1996年至今的主要流行型,此次研究亦反映了相同的现状。

表1 27起副溶血性弧菌病暴发分离菌株的血清型和基因携带情况

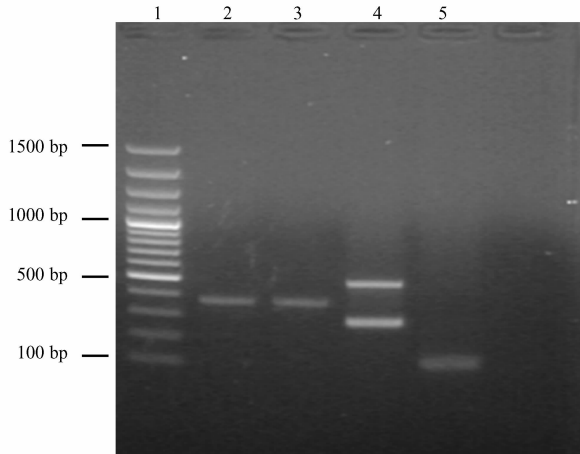
Table 1 The distribution of serotype and the virulence genes carried in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from 27 cases of foodborne disease outbreak

暴发起数编号	代表菌株号	血清型	菌株数量	分布区县	PCR结果		
					<i>toxR</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
1	3	O3:K6	1	嘉定区	+	+	-
2	33	O3:K6	3	金山区	+	+	-
3	36	O2:K3	3	南汇区	+	+	-
4	54	O11:K36	8	浦东区	+	+	-
5	62	O4:K8	4	浦东区	+	+	-
6	66	O3:K6	5	卢湾区	+	+	-
7	79	O4:K8	3	闵行区	+	+	-
8	81	O3:K6	5	金山区	+	+	-
9	93	O3:K6	3	南汇区	+	+	-
10	96	O1:K41	2	南汇区	+	+	-
11	98	O1:K25	2	南汇区	+	+	-
12	101	O4:K8	2	南汇区	+	+	-
13	172	O3:K6	1	闵行区	+	+	-
14	184	O3:K6	13	浦东区	+	+	-
15	197	O5:K68	7	浦东区	+	+	-
16	204	O3:K6	1	闵行区	+	+	-
17	246	O3:K6	2	宝山区	+	+	-
18	362	O1:K25	5	奉贤区	+	+	-
	365	O3:K48	1		+	+	+
19	371	O3:K6	3	卢湾区	+	+	-
	373	O5:K8	1		+	+	-
20	424	O5:K68	1	崇明县	+	+	-
	426	O3:K6	1		+	+	-
21	463	O3:K6	6	金山区	+	+	-
22	466	O1:K41	3	金山区	+	+	-
	467	O4:K12	1		+	+	-
23	470	O3:K29	1	闵行区	+	+	-
24	472	O3:K6	3	闵行区	+	+	-
	473	O1:K25	1		+	+	-
	476 <sup>a</sup>	O5:K17	1		+	-	-
25	477	O3:K6	1	闵行区	+	+	-
26	484	O3:K6	1	闵行区	+	+	-
27	577	O3:K6	3	南汇区	+	+	-

注:<sup>a</sup>暴发环节分离株,分离自食品盛放器具。

## 2.2 PCR 检测 *toxR*、*tdh*、*trh* 基因

毒力相关基因的检测结果显示,所有菌株 *toxR* 基因均为阳性;有 97 株细菌携带 *tdh* 基因,1 株菌株携带 *trh* 基因。编号为 365 的菌株同时携带 *tdh* 和 *trh* 基因,生化上能产生尿素酶可分解尿素。编号为 476 的环节样分离菌株既不携带 *tdh* 基因也不携带 *trh* 基因,见表 1、图 1。



1: 100bp DNA 分子量 Marker;  
2、3: 菌株 365 和菌株 476 的 *toxR* 基因 PCR 扩增产物;  
4、5: 菌株 365 和菌株 476 的 *tdh*、*trh* 基因双重  
PCR 扩增产物

图 1 菌株 365 和菌株 476 的 *toxR*、  
*tdh* 和 *trh* 基因扩增产物电泳结果

Figure 1 Electrophoresis of *toxR*, *tdh* and *trh* gene amplified by PCR from strains No. 365 and No. 476

## 2.3 Ribo 分型

Ribo 分型实验显示所有菌株均可产生 7 ~ 11 条条带,同一起暴发中相同血清型的菌株其 Ribo 型相同。对图谱进行聚类分析,按相似度可将 98 株细菌分为 5 个 Ribo 型,cutoff 值为 80%,见图 2。

本研究中的 16 起疾病暴发的 O3:K6 血清型的副溶血性弧菌归入 Vp-EcoR-002 型,其 Ribo 型不完全相同,见图 2。编号为 426 的菌株与其他 O3:K6 血清型的副溶血性弧菌在条带数量和条带位置上明显不同,提示该菌株与其他暴发分离株具有不同的基因型。

与 O3:K6 血清型同时归入 Vp-EcoR-002 型的血清型还有 O5:K68、O1:K25、O11:K36 和 O2:K3。有报道称 O5:K68 和 O1:K25 血清型其 AP-PCR 图谱与大流行 O3:K6 群菌株无法区分,提示此 2 种血清型菌株与大流行 O3:K6 菌株进化上存在密切的联系<sup>[5]</sup>。暴发编号为 4 的菌株(血清型 O11:K36)是在 2006 年 4 月引起一次食源性疾病暴发,于 8 个病人的肛拭样本中检出该血清型的细菌,其图谱与其他暴发中 O3:K6 血清型图谱一致,是引起暴发的

另一重要血清型。

O4:K8 血清型主要集中于 Vp-EcoR-001 型,其图谱与 O3:K6 存在差异(相似度约为 77%)。该血清型 1996 年之前在东亚、东南亚地区是主要的流行型,尽管目前在构成比重上有所下降,但仍是 O3:K6 以外引起食源性暴发的最重要血清型。

本研究结果显示同一起暴发中分离到的相关菌株并不具有相同的血清型或 Ribo 型。有 5 起暴发检出血清型不同的菌株,见表 1,其 Ribo 型也不尽相同,见图 2。尽管有混合感染的可能性存在,但是也不排除同一起暴发中某些血清型并不是引起暴发的病原体,而是混合于某起暴发中的散发病例。由于当时并未展开流行病学调查,现缺乏相关的流行病学资料,已无法确认某些血清型与暴发的关系。

## 3 讨论

副溶血性弧菌从首次分离至今已近 60 年,目前在副溶血性弧菌中已识别有 13 种 O 血清群和 65 种 K 血清型,其中已知与人胃肠炎有关的 O 与 K 的组合已超过 84 种。编号为 18,19,20,22,24 的 5 次暴发,分别分离到不同血清型的细菌,尽管这些血清型都是已经被证明能引起人类胃肠炎的副溶血性弧菌,但是具体到某一起暴发案例,并不能说分离到副溶血性弧菌都是引起暴发的病原体,某些血清型菌株的分离在某次暴发中可能只是一次独立于暴发的感染事件,其感染源与暴发感染源可能并不相同。血清分型是一种从事流行病学研究简易且可靠的标志物,在进行流行病学调查的时候,血清学分型能首先将分离到的菌株进行表型区分,因而在暴发调查中病原体的血清学分型是必要的。

通常情况下,携带 *tdh* 和 *trh* 基因或者两者之一的菌株被认为是产毒株<sup>[6]</sup>,除 476 号菌株外,本研究中的菌株均为产毒株。另有研究认为携带 *tdh* 基因但不携带 *trh* 基因的菌株是能够引起流行的菌型,并且 *toxR* 基因可以作为筛选流行株的可选标志物<sup>[7]</sup>,基于此观点本研究中的菌株除 476 号和 365 号外均可判定为大流行菌株。

目前一般认为 O3:K6 血清型为流行度较高的菌型,该血清型的菌株通常均携带 *tdh* 基因,同时 Laohaprerthisan<sup>[8]</sup> 和 Vuddhakul<sup>[9]</sup> 等 1998 年到 1999 年进行的研究表明非 O3:K6 血清型,如 O1:K25、O1:K41、O4:K12 亦可能是流行株。本次研究中检出的 O1:K25、O1:K41、O11:K36 是几个值得关注的非 O3:K6 血清型,由于我国缺乏分型血清,目前这些血清型的相关报道不多。

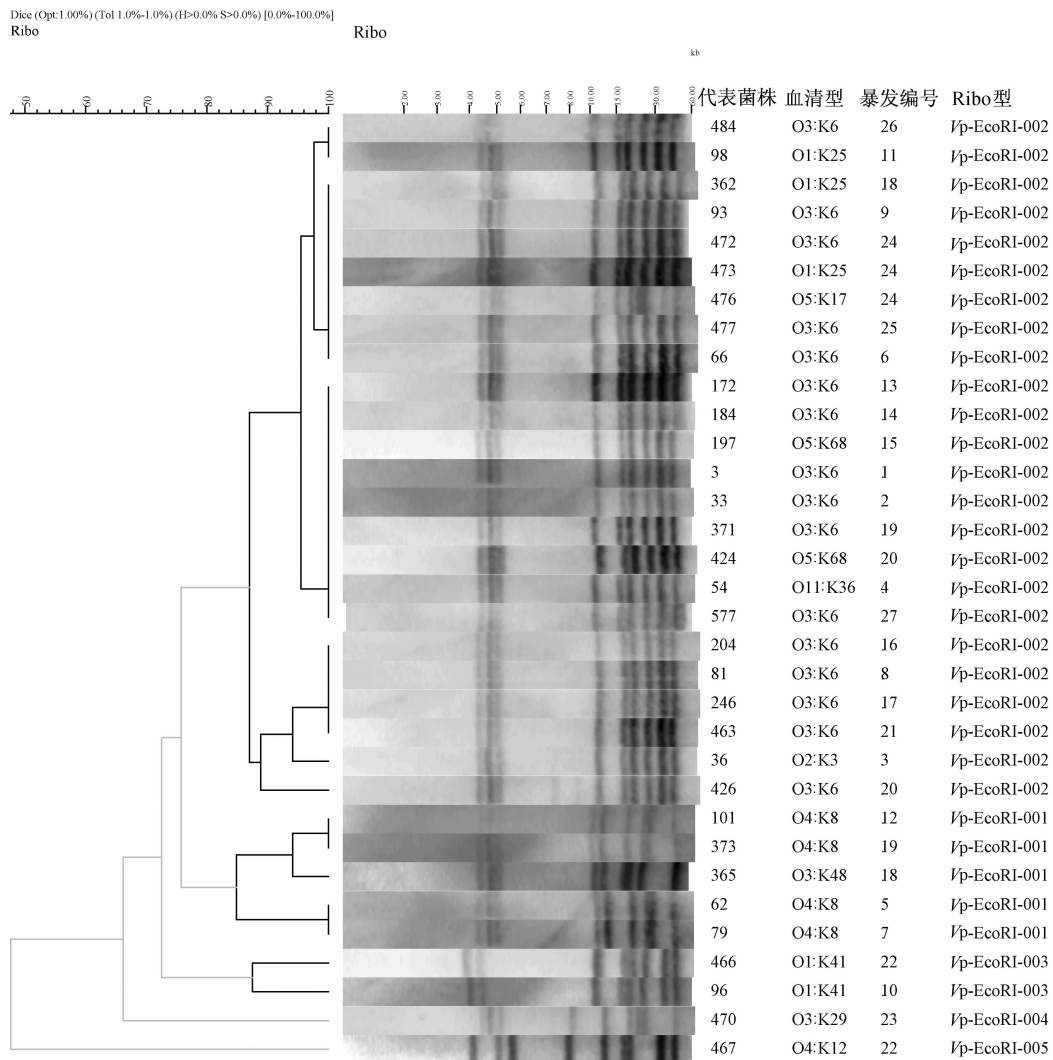


图2 副溶血性弧菌食源性疾病暴发相关菌株的 Ribo 型聚类分型

Figure 2 Ribotyping dendrogram of *V. parahaemolyticus* related to foodborne disease outbreaks

Chowdhury 等<sup>[10]</sup>采用 Ribo 分型技术对副溶血性弧菌进行分型,研究显示血清型为 K68 与 K6 的菌株具有相同的带型。本研究也显示了相同情况,另外 O1:K25、O11:K36 与 O3:K6 血清型的菌株也呈相同带型,提示 Ribo 分型技术对副溶血性弧菌的分型灵敏度较低,甚至不能区分不同的血清型。

有研究表明同一食品样本中可分离到多种血清型的副溶血性弧菌,并且 Vuddhakul<sup>[11]</sup>和 Phuangthip<sup>[12]</sup>等于 2000 年至 2002 年证实在海产品中检出的副溶血性弧菌中产毒株仅占 5.3%,提示要确定导致发病的菌株,还应确认病人和食品中分离到的细菌是否具有同样的血清型和基因型。

## 参考文献

- [1] CORDOVA J L, ASTORGA J, SILVA W, et al. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak [J]. Biol Res, 2002, 35 (3-4): 433-440.
- [2] 罗雪云,刘宏道,周桂莲,等. 食品卫生微生物检验标准手册 [M]. 北京:中国标准出版社,1997:83-98.
- [3] KIM Y B, OKUDA J, MATSUMOTO C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (4): 1173-1177.
- [4] 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]. J Microbiol Methods, 1999, 36 (3): 215-225.
- [5] BHUIYAN N A, ANSARUZZAMAN M, KAMRUZZAMAN M, et al. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh and significance of its distribution across different serotypes [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40 (1): 284-286.
- [6] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. Infect Immun, 1995, 63 (6): 2093-2099.
- [7] MATSUMOTO C, OKUDA J, ISHIBASHI M, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (2): 578-585.

[ 8 ] LAOHAPRERTTHISAN V, CHOWDHURY A, KONGMUANG U, et al. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand [ J ]. *Epidemiol Infect*, 2003, 130 ( 3 ): 395-406.

[ 9 ] VUDDHAKUL V, CHOWDHURY A, LAOHAPRERTTHISAN V et al. Isolation of a pandemic O3: K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand [ J ]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 ( 6 ): 2685-2689.

[ 10 ] CHOWDHURY N R, CHAKRABORTY S, RAMAMURTHY T, et al. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains [ J ]. *Emerg Infect Dis*, 2000, 6 ( 6 ): 631-636.

[ 11 ] VUDDHAKUL V, SOBOON S, SUNGHIRAN W, et al. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species ( *Meretrix meretrix*, *Perna viridis*, and *Anadara granosa* ) and their association with food-borne disease in southern Thailand [ J ]. *J Food Prot*, 2006, 69 ( 11 ): 2615-2620.

[ 12 ] BHOOPONG P, PALITTAPONGARNPIM P, POMWISED R, et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients [ J ]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45 ( 5 ): 1544-1550.

论著

两种选择性培养基 HE、CAS 检测沙门菌效果的比较

闫琳, 王晓英, 郭云昌, 裴晓燕, 余东敏

( 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021 )

**摘要:**目的 比较两种沙门菌选择性培养基 HE 和 CAS 在食物样本检测中的敏感性、准确性和时效性。方法 观察典型沙门菌和非沙门菌在两种选择培养基上的生长状况和菌落形态。通过人工染菌实验, 比较两种选择性培养基分离沙门菌的检测效果。采集 16 份市售整鸡样本, 进一步比较两种培养基沙门菌的阳性检出率。结果 沙门菌在 HE 平板上为绿色菌落, 大多有黑心; 在 CAS 平板上为紫色菌落。含菌量为 10 CFU/25 g 鸡肉样本, 经 SC 增菌液增菌培养 8 h, 可用 CAS 检出沙门菌; 而采用 HE 则需增菌 18 h 才可检出。16 份整鸡样本, 增菌 8、12 和 18 h, 采用 CAS 的阳性检出率分别为 43.75%、31.25% 和 37.5%, 相应时间下采用 HE 的阳性检出率分别为 18.75%、25% 和 18.75%。8 份新鲜整鸡样本, 检出 4 份阳性; 8 份冷冻整鸡样本, 检出 3 份阳性。结论 CAS 选择性平板可抑制大多杂菌生长, 沙门菌在其上菌落形态较易鉴别。CAS 分离沙门菌的检出时限和检测灵敏度都明显优于 HE, 建议在食物样本检测沙门菌时应首选 CAS。

**关键词:** HE 培养基; CAS 培养基; 沙门菌; 比较

中图分类号: R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)02-0118-05

Comparing the effectiveness of two selective media HE and CAS for the detection of *Salmonella* in foods

Yan Lin, Wang Xiaoying, Guo Yunchang, Pei Xiaoyan, Yu Dongmin

( National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China )

**Abstract: Objective** To compare the effectiveness of two kinds of selective media HE (hektoen enteric agar) and CAS (CHROM agar *Salmonella* medium) on the detection of *Salmonella* in food samples. **Methods** The growth status and the morphology of *Salmonella* and non-*Salmonella* colonies on HE and CAS were observed. Twenty five grams of chicken meat were distributed in 225 ml of SC (Selenite Cystine Broth) and *Salmonella* standard strain CMCC 50041 was used to perform artificially-contaminated experiments. The final concentration of *Salmonella* for each sample was 0, 1, 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>6</sup> CFU per 25g poultry respectively. All samples were incubated at 37 °C for 0, 4, 8, 12 and 18 h. One loop from each culture medium taken at different incubation time was streaked on HE or CAS plates. The suspected *Salmonella*

收稿日期: 2010-09-20

基金项目: 国家自然科学基金 (30571575); 科技部科研院所技术开发研究专项 (2009EG150293)

作者简介: 闫琳 女 硕士生 研究方向为食品微生物学 Email: yanlin1224@sina.com

通信作者: 王晓英 女 研究员 硕士生导师 研究方向为食品微生物学