

论著

# 江苏及周边地区副溶血性弧菌分子流行病学特征研究

刘丽萍<sup>1,2</sup>, 陈盛霞<sup>1</sup>, 徐岚<sup>2</sup>, 李薇薇<sup>3</sup>, 裴晓燕<sup>3</sup>, 郭云昌<sup>3</sup>

- (1. 江苏大学基础医学与医学技术学院, 江苏 镇江 212013;
- 2. 镇江市疾病预防控制中心, 江苏 镇江 212000;
- 3. 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 了解江苏及周边地区副溶血性弧菌的分子流行病学特征。方法 对 2010 年江苏及周边地区食物中毒事件中分离的、经 API 生化鉴定的 63 株副溶血性弧菌进行毒力基因(*tdh*、*trh*)测定、血清学分型和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型。结果 *tdh* 阳性率 79.4% (50/63), *trh* 阳性率 1.6% (1/63); 病人株血清型以 O3: K6 为主 (26/57), 食品株以 O1: KUT 为主 (4/6); PFGE 分型显示 A-E 群间相似度大于 60%。结论 江苏及周边地区中不同地区的副溶血性弧菌具有高度同源性, 该地区副溶血性弧菌引起的食物中毒可能具有相同的污染源。

**关键词:**副溶血性弧菌; 血清型; 同源性; 食源性致病菌

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)02-0106-04

## Molecular epidemiology traits of *Vibrio parahaemolyticus* in Jiangsu and surrounding areas

Liu Liping, Chen Shengxia, Xu Lan, Li Weiwei, Pei Xiaoyan, Guo Yunchang

(School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Jiangsu Zhenjiang 212013, China)

**Abstract: Objective** To understand the molecular epidemiology traits of *Vibrio parahaemolyticus* in Jiangsu and surrounding areas. **Methods** Biochemical identification, *tdh* and *trh* gene detection, serological typing and pulse-field gel electrophoresis (PFGE) were applied to 63 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from food poisoning incidents occurred in Jiangsu and surrounding areas in 2010. **Results** The positive rates of *tdh* and *trh* were 79.4% (50/63) and 1.6% (1/63) respectively. The main serological type of strains isolated from patients was O3: K6 (26/57), and that from food was O1: KUT (4/6). The patterns of PFGE showed that the similarity of groups from A to E was more than 60%. **Conclusion** Strains isolated from different regions in Jiangsu and surrounding areas were in high homology. The food poisoning incidents occurred in these areas might be contaminated by *Vibrio parahaemolyticus* strains from the same source.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; serological type; homology; foodborne pathogens

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是一种嗜盐性革兰阴性非芽孢菌, 主要分布于近海海水、海底沉积物、海河交界处、海产品及盐渍食品中, 江河水及鱼虾蟹等淡水产品中也可以检出大量副溶血性弧菌。副溶血性弧菌主要引起以急性腹泻、呕吐和发烧为主要症状的急性肠胃炎和败血症, 是夏秋季食物中毒的主要致病菌。由该菌引起的食物中毒位居江苏及周边地区细菌性食源性疾病暴发的首位<sup>[1]</sup>。本研究通过对 2010 年江苏及周

边地区食物中毒事件中检出的副溶血性弧菌进行毒力基因、血清分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型检测, 建立数据库, 以了解江苏及周边地区副溶血性弧菌的分子流行病学特征。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株

2010 年从江苏及周边地区食物中毒事件中采集 63 株副溶血性弧菌, 其中 57 株来源于病人, 6 株来源于食品。所有菌株均用法国梅里埃生物技术有限公司的 API 20E 生化试条鉴定。鉴定及 PCR 实验中的阳性对照菌株为 RIMD2210633。PFGE 实验中相对分子量标准为 Braenderup 沙门菌 H9812。

#### 1.2 仪器

7500 型荧光定量 PCR 仪, CHEF-mapper 脉冲场凝胶电泳仪, Gel Doc XR 凝胶成像系统, BioMérieux

收稿日期: 2011-11-22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2010350); 镇江市科技支撑—社会发展项目(SH2011068)

作者简介: 刘丽萍 女 主管技师 硕士生 研究方向为病原生物学 E-mail: 631651115@qq.com

通信作者: 徐岚 女 副主任技师 研究方向为食源性致病菌 E-mail: xl4414093@yahoo.com.cn

Vitek 浊度计,水浴恒温振荡器,纯水仪。

### 1.3 试剂和耗材

API20E 及配套试剂(生物梅里埃,法国),副溶血性弧菌诊断血清(生研公司,日本)TDH 荧光定量 PCR 检测试剂盒、TRH 荧光定量 PCR 检测试剂盒(生科源生物技术有限公司),15 ml 离心管。

脑心浸液肉汤、脑心浸液琼脂,蛋白酶 K (Merck, 德国),限制性内切酶 Xba I、Sfi I (Promega, 美国),细胞悬浮液(CBS),琼脂糖(Seakem Gold, SKG),EDTA, TE 缓冲液,溴化乙锭(EB)染液。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 生化鉴定

采用 API 20E 生化鉴定试条。

#### 1.4.2 毒力基因测定

实时荧光定量 PCR 试剂盒。

#### 1.4.3 血清学分型

根据日本生研公司的副溶血性弧菌诊断血清(74 种 K 血清、11 种 O 血清)使用说明进行血清凝集实验。将过夜培养的纯菌制成菌悬液(3% NaCl、5% 甘油),用菌悬液与 K 血清进行凝集,观察结果,如果不凝,将此菌定为 K 无法分型,用 KUT 表示。同时用生理盐水做对照实验。将菌悬液 121 °C 高压灭菌 1 h,4 000 r/min 离心 15 min。弃上清,用生理盐水洗涤沉淀,离心,重复 3 次。然后用少量生理盐水将沉淀制成菌悬液,与 O 血清进行凝集实验。如果 O 抗原均不凝集,则 O 抗原未知。

#### 1.4.4 脉冲场凝胶电泳分型

根据美国 PulseNet 霍乱弧菌-PFGE 的标准分型方法及其方法优化的参考文献<sup>[2,3]</sup>进行实验。挑取适量过夜培养的新鲜菌落溶于 CSB 溶液中制备成透光度为 20% 的菌悬液。取 200  $\mu$ l 菌悬液,加入 10  $\mu$ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)和 200  $\mu$ l Seakem Gold 琼脂糖(1%),制备胶块。用含蛋白酶 K 的细胞裂解液裂解胶块中包被的细菌,分别用超纯水和 TE 缓冲液洗涤。然后切取 2 mm 宽的胶块,用限制性内切酶 Sfi I 酶切 4 h(50 °C)。酶切好的胶块置于梳子齿上,倒入溶化的 1% SKG,制胶。使用 CHEF-mapper XA 型脉冲场凝胶电泳槽电泳。电泳条件为:low MW-78 kb,high MW-396 kb,电泳时间 19 h,起始转换时间 18 s,终止电泳时间 35 s。电泳后在 1  $\mu$ g/ml 的 EB 溶液中染色 30 min,用超纯水脱色 30 min。GEL DOC XR 凝胶成像系统拍摄图像,图谱导入 BioNumerics 软件,用非加权配对算数平均法(UPGMA)进行聚类分析,相似系数用 Dice 表示,范围在 0~100 之间,0 表示完全不相关,100 表示完全

相同。出现不同的条带即判定为不同的型。

## 2 结果

### 2.1 生化鉴定

63 株菌经 API 20E 生化试条鉴定为副溶血性弧菌。

### 2.2 毒力基因测定

63 株菌中,*tdh* 阳性率为 79.4%(50/63),*trh* 阳性率为 1.6%(1/63),6 株来源于食品的菌株其 *tdh* 和 *trh* 均为阴性,病人中检出的 57 株菌株有 1 株菌 *tdh* 和 *trh* 均为阳性。

### 2.3 血清学分型

病人株血清型以 O3:K6 为主(26/57),食品株以 O1:KUT 为主(4/6),病人株中有 2 株菌未能定型,见图 1。

### 2.4 脉冲场凝胶电泳分型

电泳时有 7 株菌降解,其中 5 株为病人株,2 株为食品株。其他 56 株菌的酶切条带分子量主要集中在 30~700 kb 之间,基因组 DNA 被限制性内切酶 Sfi I 酶切的条带数为 14~20 条,共切出 39 条不同的带型。将酶切图像的数据导入 BioNumerics,根据 Tenover 等<sup>[4]</sup>引入的标准,Sfi I 酶切将 56 株菌分成 7 个 PFGE 群,A、B 群是优势群,占菌株数量的 75.0%。用 BioNumerics 分析 Dice 相关系数及树状图,见图 1。

## 3 讨论

63 株菌中,*tdh* 阳性率为 79.4%,*trh* 阳性率为 1.6%,6 株食品株均无毒力基因,与文献报道的食品中有毒力基因菌株检出率极低的情况一致<sup>[5-7]</sup>,而病人体内检出的菌株大多有毒力基因,可能是无毒力基因的菌在人体繁殖时通过某种基因转移机制获得了毒力基因,也可能由于检验方法存在问题而未能大量检出环境中有毒力基因的菌株<sup>[8]</sup>。

副溶血性弧菌在 1996 年前的流行菌株血清型是 O4:K8,1996 年在印度加尔各达暴发流行并蔓延至全世界后形成 O3:K6 大流行克隆<sup>[9-11]</sup>。本研究中,病人株血清型以 O3:K6 为主(26/57),其他血清型中有 5 株为 O4:K8,5 株为 O1:KUT,4 株为新血清型 O1:K36;食品株则以 O1:KUT 为主(4/6),与其他地区检出的菌株血清型的分布相似<sup>[12-13]</sup>。优势群中,A 群以 O3:K6 为主(18/30),其中 A<sub>3</sub> 中的 3 株 O3:K6 与 2 株 O1:KUT 基因型完全一致(10VP1003、10VP1004、10VP1009、10VP1015、10VP1017)。表明本研究中存在“血清型变异”机制<sup>[13]</sup>,即与优势菌群 O3:K6 有相同基因型和分子

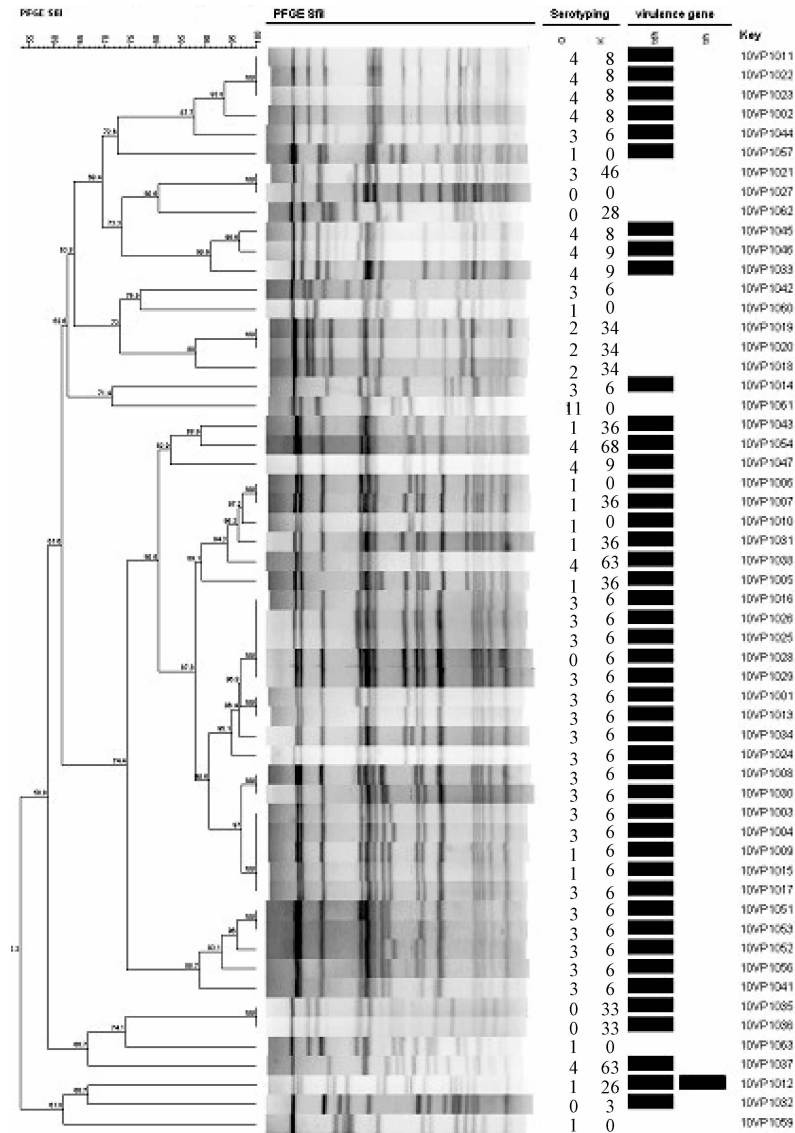


图1 江苏及周边地区副溶血性弧菌 PFGE 分型聚类树状图(Sfi I 酶切)

Figure 1 PFGE pattern of *Vibrio parahaemolyticus* in Jiangsu and surrounding areas(restriction enzyme Sfi I )

特征的其他型菌群是由同一株 O3: K6 菌株 O、K 抗原变异而来,也就是说 A<sub>3</sub> 中的 2 株 O1: KUT 是由 O3: K6 变异而来,而 A<sub>2</sub> 中 1 株 O1: KUT 与 1 株 O1: K36 基因型完全一致 (10VP1006、10VP1007),说明 O1: K36 可能是由 O1: KUT 变异而来。因此,新血清型 O1: K36 可能是由 O3: K6 变异产生,O1: KUT 则可能是变异的中间血清型,其 K 抗原未凝集可能是因变异未彻底完成所致。由此推测,本研究中 2 株未定型的菌可能正在发生变异,其中 1 株和 4 株菌 O3: K6 基因型完全一致 (10VP1028、10VP1016、10VP1025、10VP1026、10VP1029),说明该菌株变异前的血清型可能为 O3: K6。

在 PFGE 实验中,7 株菌降解的原因不明,其他 56 株菌分成 7 个 PFGE 群,除 F、G 群的 7 株菌外,另外的 5 个群间相似性系数 > 60%,总体看来各菌株亲缘关系较近。PFGE 分型结果显示,A<sub>3</sub> 中 5 个

基因型完全一致的菌株 (10VP1003、10VP1004、10VP1009、10VP1015、10VP1017) 分别来源于 3 个不同地区的食物中毒事件,说明它们属于同一个克隆,提示这 3 起食物中毒可能有相同的污染源,或相同进货渠道,应追踪其来源,并进行监督,防止再次发生食物中毒事件。

PFGE 是分子分型的金标准方法,但如果反应条件不一样,则各实验室结果无可比性,中国 2004 年加入 PulseNet 网络,成立 PulseNet China 实验室,建立标准化方案和数据库。本研究中 PFGE 的方法采用 PulseNet China 的标准方法,与全球不同实验室中同方法的结果具有可比性,可通过不断扩充菌种数量以建立江苏省的副溶血性弧菌的 PFGE 数据库。在应对食物中毒等食源性突发公共卫生事件时,可根据来自同一亲代的个体具有共同遗传物质的特性,通过查找、比对 PFGE 数据库中的信息,比

较指纹图谱是否具有同源性,来确定菌株的亲缘关系,从而确定传染源和流行范围。

## 参考文献

- [1] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992—2001年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病预防网[J]. 卫生研究,2004,33(6):725-727.
- [2] 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 Pathog Dis, 2007,4(3):285-292.
- [3] KAM K M, LUEY C K Y, PARSONS M B, et al. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8):2766-2773.
- [4] 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]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9):2233-2239.
- [5] 陈苏云,张俊彦,王赞信,等. 海水产品副溶血性弧菌污染定量检测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(2):336-338.
- [6] 李薇薇,王晓英,郭云昌,等. 中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(3):239-243.
- [7] CHAO Guoxiang, JIAO Xinan, ZHOU Xiaohui, et al. Distribution, prevalence, molecular typing, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China [J]. Food Control, 2009, 20:907-912.
- [8] 李薇薇,裴晓燕,朱海明,等. 采用脉冲场凝胶电泳和自动化核糖体分型技术分析 MPN 法分离出的副溶血性弧菌的同源性[J]. 卫生研究,2010,39(3):239-243.
- [9] OKUDA J, JSHIBASHI M, HAYAKAWA E, et al. Emergence of a unique O3: K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12):3150-3155.
- [10] CHOWDHURY A, ISHIBASHI M, THIEM V D, et al. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999 [J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(4):319-327.
- [11] WONG H C, LIU S H, KU L W, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan [J]. J Food Prot, 2000, 63(7):900-906.
- [12] CHAO Guoxiang, JIAO Xinan, ZHOU Xiaohui, et al. Serodiversity, pandemic O3: K6 clone, molecular typing, and antibiotic susceptibility of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Jiangsu, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2009, 8(6):1-8.
- [13] NAIR G B, RAMAMURTHY T, BHATTACHARYA S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3: K6 and its serovariants [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20:39-48.

## 论著

# 毒理学关注阈值方法的建立及其在食品接触材料评估中的应用

隋海霞,张磊,毛伟峰,李建文,刘爱东,刘兆平  
(国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

**摘要:**目的 以邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)为模式化学物,建立可用于食品接触材料的毒理学关注阈值(TTC)风险评估方法。方法 建立基于Cramer结构分类的TTC决策树方法;利用Cramer结构分类流程和Toxtree软件对DEHP进行Cramer结构分类;利用2002年中国居民营养与健康状况调查数据和部分食物中DEHP的监测数据,估计我国不同年龄组人群通过饮料、植物油、发酵乳、方便面、果冻、果酱的DEHP暴露量,并按照TTC决策树方法对DEHP进行风险评估;同时,采用传统的风险评估方法进行验证。结果 DEHP属于Cramer I类结构,其对应的TTC阈值为30  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 。我国居民的DEHP最大暴露量为4.06  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ ,4个年龄组的最大暴露量为11.10  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ ,分别占DEHP TTC阈值的13.5%和37.0%。按照DEHP的健康指导值——每日耐受摄入量(TDI)(50  $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ )计算,全人群和4个年龄组的最大暴露量分别占TDI的8.1%和22.2%,两种方法的风险评估结果基本一致。结论 TTC决策树方法是一种有效的风险评估工具,可用于食品接触材料的优先筛选和初步评估。我国居民膳食DEHP的健康风险较低,不需要引起健康关注。

**关键词:**邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;增塑剂;毒理学关注阈值;风险评估;Cramer分类

收稿日期:2011-11-28

基金项目:食品中化学危害健康风险表征与膳食暴露评估技术研究(2012BAK01B01)

作者简介:隋海霞 女 副研究员 研究方向为食品化学物的风险评估 E-mail:haixiasui@yahoo.com.cn

通信作者:刘兆平 男 研究员 研究方向为食品化学物的风险评估 E-mail:liuzhaoping2010@163.com