

- [11] 郭红勤, 詹磊. 固相萃取-气相色谱质谱法测定茶叶中11种农药残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(5): 1346-1350.
- [12] ZHU B Q, XU X Y, LUO J W, et al. Simultaneous determination of 131 pesticides in tea by on-line GPC-GC-MS/MS using graphitized multi-walled carbon nanotubes as dispersive solid phase extraction sorbent[J]. Food Chemistry, 2019, 276: 202-208.
- [13] BENETA A, MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ D, PERIŠA I, et al. Multiresidue GC-MS/MS pesticide analysis for evaluation of tea and herbal infusion safety [J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2018, 98(11): 987-1004.
- [14] CHEN Y, LOPEZ S, HAYWARD D G, et al. Determination of multiresidue pesticides in botanical dietary supplements using gas chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry (GC-MS/MS)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(31): 6125-6132.
- [15] 潘煜辰, 伊雄海, 邓晓军, 等. 亚临界水萃取及气相色谱-串联质谱法检测红茶中多种农药残留[J]. 色谱, 2012, 30(11): 1159-1165.
- [16] 林竹光, 陈美瑜, 张莉莉, 等. 气相色谱-负离子化学源质谱法分析牛奶饮品和奶粉中19种有机磷农药残留[J]. 分析测试学报, 2007, 26(3): 331-334.
- [17] ZHU P, MIAO H, DU J, et al. Organochlorine pesticides and pyrethroids in Chinese tea by screening and confirmatory detection using GC-NCI-MS and GC-MS/MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(29): 7092-7100.
- [18] 胡贞贞, 沈国军, 邵铁锋, 等. 加速溶剂萃取-气相色谱-负离子化学源质谱法测定茶叶中有机氯和拟除虫菊酯类农药残留量[J]. 分析实验室, 2009, 28(1): 80-83.
- [19] 刘丽, 张琦, 王海雁, 等. 串联双柱固相萃取-气相色谱-串联质谱法检测茶叶中拟除虫菊酯[J]. 色谱, 2017, 35(8): 860-866.
- [20] 李燕妹, 连增维. QuEChERS结合气相色谱-负离子化学源质谱法测定蔬菜水果中37种农药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5074-5079.

研究报告

4起副溶血性弧菌食源性疾病暴发事件分离株病原学特征和溯源分析

吴莹¹, 王银平¹, 李心朋², 刘军¹

(1. 淄博市疾病预防控制中心, 山东 淄博 255026; 2. 山东省疾病预防控制中心, 山东 济南 250014)

摘要:目的 分析2019年淄博市4起副溶血性弧菌食源性疾病暴发事件分离株的病原学特征。方法 采用血清学分型、毒力基因检测(*tlh*, *tdh*, *trh*)、微量肉汤稀释法药敏试验和脉冲场凝胶电泳(PFGE)对11株分离株进行分析。结果 9株患者分离株血清型鉴定为O3:K6型, 毒力基因均为 $tlh^+tdh^+trh^-$; 2株环境分离株血清型分别为O8:K22和O1:K32型, 毒力基因均为 $tlh^+tdh^-trh^-$ 。11株分离株全部对头孢唑林耐药, 部分菌株对氨苄西林和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑耐药。其中, 2株对3种抗生素均耐药, 对其他抗生素均敏感。经PFGE聚类分析, 同一暴发事件中患者分离株高度相关。结论 4起暴发事件的患者分离株均为流行株O3:K6型, 均携带*tdh*基因, 部分菌株出现多重耐药情况, 同一暴发事件的分离株之间同源性高, 提示可能为同源暴发, 应加强对副溶血性弧菌污染源头的监管力度, 减少食源性疾病的发生。

关键词:副溶血性弧菌; 血清型; 毒力基因; 药物敏感性; 脉冲场凝胶电泳

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)04-0422-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.04.003

Virulence gene detection and traceability analysis of 4 *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning incidents

WU Ying¹, WANG Yinping¹, LI Xinpeng², LIU Jun¹

(1. Zibo Center for Disease Prevention and Control, Shandong Zibo 255026, China;

2. Shandong Center for Disease Prevention and Control, Shandong Ji'nan 250014, China)

Abstract: Objective To analyze the etiological characteristics of strains isolated from *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning incidents occurred in Zibo in 2019. **Methods** Serotyping and virulent genes (*tlh*, *tdh*, *trh*) were detected by

real-time fluorescent polymerase chain reaction, antibiotic sensitivity was examined by broth microdilution method and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) were applied to *Vibrio parahaemolyticus*. **Results** The 9 strains collected from patients were all pandemic O3 : K6, and the virulence genes were $tlh^+tdh^+trh^-$. The 2 strains collected from environmental samples were O8 : K22 and O1 : K32, and the virulence genes were all $tlh^+tdh^-trh^-$. All strains were resistant to cefazolin, and partially resistant to ampicillin and trimethoprim/sulfametho-xazole. There were 2 strains even showed multiple resistance to these three antibiotics, while all strains were sensitive to the other antibiotics. The PFGE homology from the same incident was high. **Conclusion** The strains collected from patients in the 4 incidents were all pandemic O3 : K6 and the virulence genes were tdh^+ , some of which showed multi-antibiotic resistance, and the isolates from the same outbreak had high homology suggesting that they had been exposed to the same pollution source. The supervision of pollution sources should be strengthened to reduce the occurrence of foodborne diseases.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; virulence genes; antibiotic sensitivity; pulsed field gel electrophoresis

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是嗜盐性弧菌,多存在于海水产品中,食用被该菌污染的食品后,会出现腹泻、呕吐、发热等胃肠症状^[1]。在沿海省份和地区,由 VP 引起的食源性疾病暴发呈明显上升趋势,已超过沙门菌,高居首位^[2]。而 VP 耐热性直接溶血素基因 (tdh) 和耐热性相关溶血素基因 (trh) 是其致病性主要毒力因子,与该菌的致病能力密切相关^[3-4]。细菌耐药性随着抗生素不规范使用而日趋严重,耐药菌株不断增加,甚至出现多重耐药现象^[5-6]。本研究对 2019 年淄博市 4 起食源性疾病暴发事件中分离的 11 株副溶血性弧菌,进行血清学分型、毒力基因检测、药物敏感性试验、脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 分型,分析其致病因素和流行病学特征,为控制食源性疾病提供预防和诊疗依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

2019 年淄博市 4 起副溶血性弧菌食源性疾病暴发事件中分离菌株 11 株,其中 9 株来源于患者,2 株来源于案板刀具涂抹物。质控菌株为沙门菌 H9812(购自广东环凯微生物科技有限公司)。

1.1.2 主要仪器与试剂

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (德国 Bruker MALDI-TOF MS autoflex speed LIN), ABI Q5 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI), Geldoc XR+凝胶成像仪 (美国伯乐)。

3%氯化钠碱性蛋白胨水、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基 (Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS) 琼脂、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂均购自北京陆桥技术股份有限公司,弧菌显色培养基 (上海科玛嘉微生物技术有限公司),副溶血性弧菌诊断血清 (日本生科研),副溶血性弧菌三重

核酸荧光 PCR 法检测试剂盒 (深圳生科原生物股份有限公司),革兰阴性需氧菌药敏检测板 (上海星佰生物技术有限公司),蛋白酶 K (德国 Merck),限制性内切酶 *Sfi* I (日本 TaKaRa),细胞悬浮液 (CSB), Seakem Gold (SKG) 琼脂糖,乙二胺四乙酸二钠 (EDTA),TE 缓冲液,溴化乙锭 (EB) 染液。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离鉴定

参照 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]对菌株进行增菌培养及分离纯化,利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪进行鉴定。

1.2.2 血清学鉴定

自 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板挑取新鲜培养的菌苔置于 3%氯化钠和 5%甘油溶液中充分研磨混匀,获得浓厚的菌悬液。取适量制备好的菌悬液进行 K 抗原的鉴定,另取适量菌悬液 121 ℃ 灭菌 1 h。灭菌后 4 000 r/min 离心 15 min (离心半径 33.5 cm),弃去上层液体,沉淀用等体积生理盐水洗 3 次,每次 4 000 r/min 离心 15 min (离心半径 33.5 cm),最后一次离心后留少许上层液体,混匀制成菌悬液。血清学鉴定具体步骤参照 GB 4789.7—2013^[7]。

1.2.3 毒力基因检测

挑取新鲜培养的菌苔于 100 μL DNA 裂解液中充分研磨,100 ℃ 水浴 10 min 后冰浴 5 min,12 000 r/min 离心 2 min (离心半径 11.2 cm),取上清液待用。采用三重实时荧光 PCR 法,在同一个反应体系中同时检测副溶血性弧菌毒力基因 tlh 、 tdh 、 trh 。结果以循环阈值 (Ct 值) ≤ 36 判为阳性,Ct 值 ≥ 39 或无 Ct 值判为阴性,Ct 值在 36~39 之间则需进行重复检测。

1.2.4 药敏试验

参照美国临床和实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的抗生

素选择原则和微量肉汤稀释法,选择12种抗生素进行药物敏感性试验,测定最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentrations, MIC),结果判定参照CLSI标准^[8]。

1.2.5 PFGE分型

参考美国Pulse Net PFGE标准化分型方法及对副溶血性弧菌PFGE优化的参考文献进行^[9]。沙门菌标准菌株(H9812)作为分子标准,内切酶选用Xba I,试验菌株内切酶选用Sfi I。挑取培养14~18 h的新鲜菌落进行凝胶块制备、细菌裂解、DNA酶切、电泳, GelRed染色成像后使用Bionumerics 7.6软件进行聚类分析。

2 结果

2.1 血清学鉴定及毒力基因检测结果

11株VP分离株中,2株环境涂抹物分离株血清型分别为O8:K22和O1:K32型,毒力基因为*tlh*⁺*tdh*⁻*trh*⁻;9株患者分离株血清型均为O3:K6型,毒力基因均为*tlh*⁺*tdh*⁺*trh*⁻,见表1。

表1 11株VP分离株血清型鉴定及毒力基因检测结果

Table 1 Identification result of serotype and virulence genes of 11 VP isolates

菌株编号	来源	血清型	毒力基因
2019FBDVP002	生案板涂抹物	O8:K22	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP003	生肉案板、刀涂抹物	O1:K32	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁻ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP004	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP005	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP006	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP007	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP008	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP009	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP013	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP014	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻
2019FBDVP015	患者粪便	O3:K6	<i>tlh</i> ⁺ <i>tdh</i> ⁺ <i>trh</i> ⁻

2.2 药敏试验结果

11株VP分离株中,所有菌株均对头孢唑林(CFZ)耐药,部分菌株对氨苄西林(AMP)和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑(SXT)耐药,其中有2株菌株出现多重耐药情况;所有菌株对氨苄西林/舒巴坦(AMS)、头孢他啶(CAZ)、头孢西丁(CFX)、头孢噻肟(CTX)、亚胺培南(IMP)、庆大霉素(GEN)、四环素(TET)、环丙沙星(CIP)、氯霉素(CHL)敏感,见表2和3。

2.3 PFGE分型结果

对PFGE条带图谱进行聚类分析,以相似度100%为判定标准,11株VP分离株可分成8个带型。其中,暴发事件1中涂抹物分离株和患者分离株带型差异较大;暴发事件2的4株分离株中有

表2 11株VP分离株药敏试验结果

Table 2 抗生素	Results of drug susceptibility test of 11 VP isolates		
	敏感性/%		
	敏感	中介	耐药
AMP	9.09 (1/11)	63.64 (7/11)	27.27 (3/11)
AMS	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
TET	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
CHL	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
CFZ	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)	100.00 (11/11)
SXT	81.82 (9/11)	0.00 (0/11)	18.18 (2/11)
CIP	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
CAZ	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
IMP	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
CFX	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
CTX	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)
GEN	100.00 (11/11)	0.00 (0/11)	0.00 (0/11)

表3 11株VP耐药分离株的耐药谱分布

Table 3 Drug resistance spectrum of drug resistant VP isolates

抗生素耐药谱	菌株数	占比/%
AMP	3	27.27
CFZ	11	100.00
SXT	2	18.18
AMP-CFZ	3	27.27
AMP-CFZ-SXT	2	18.18

3株的带型100%相似(V型);暴发事件3中的1株分离株带型为IV型;暴发事件4的2株分离株带型100%相似(III型)。带型III和IV相似度在90%以上,带型VI和VII相似度在90%以上,推测为同一个克隆的不同亚型(见图1)。

3 讨论

VP的鞭毛抗原(H抗原)特异性不高,其血清分型主要以菌体抗原(O抗原)和荚膜抗原(K抗原)进行区分,不同血清型均可引起食源性疾病暴发,其中,携带*tdh*基因的O3:K6型是主要血清型^[10-11]。*tdh*和*trh*是VP最主要毒力基因,与其致病性密切相关^[12]。本研究的11株VP分离株中,9株患者分离株血清型均为O3:K6型,且都携带*tdh*基因,而2株环境涂抹物分离株的血清型分别为O8:K22和O1:K32型,且均不携带*tdh*和*trh*基因。环境涂抹物分离株和患者分离株毒力基因有较大差异,可能是由于环境变化或宿主免疫压力而发生了基因变异^[1],以往研究结果显示,环境或食品中VP分离株大多不含*tdh*和*trh*基因,而临床分离株大多含有*tdh*基因,含*trh*基因菌株相对较少,而*tdh*阳性菌株与暴发具有更高的流行病学关联^[13],这与本研究结果一致,也与淄博市市售食品分离株毒力基因的携带情况一致^[4]。

本研究11株VP分离株的药敏试验结果与山东省青岛市的研究情况^[14]相似。值得关注的是,本研究发现了对AMP、CFZ和SXT同时耐药的

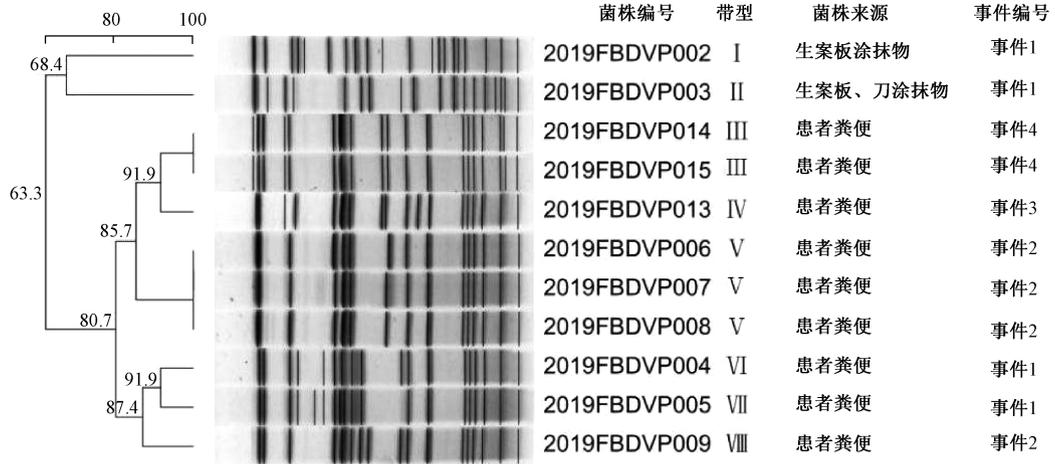


图1 VP菌株聚类分析树状图

Figure 1 Dendrogram of PFGE patterns of VP

重耐药菌株,提示应加强动物养殖和临床用药的科学指导和合理规范使用,减少抗生素的选择性压力,降低VP耐药性和多重耐药风险。

PFGE分型结果显示,4起暴发事件的分离株带型之间差异较大,说明每起暴发事件均由不同的优势型别引起,但有3起事件的病例分离株PFGE带型相似度在90%以上,其中2起为100%,推测可能为同源暴发。同一暴发事件中环境样品分离株和患者标本分离株之间、不同患者标本分离株之间的抗生素敏感性及其PFGE带型相似度并不完全一致,可能由于受检测方法和灵敏度的影响,未检出多个克隆的致病性菌株所致^[15]。

大流行株和多重耐药株的出现,应引起食品安全监督管理和公共卫生部门的高度关注,加强食品中VP污染和VP食源性疾病监测,逐步构建淄博市VP分子溯源数据库,为防治控制策略提供科学依据。

参考文献

- [1] 刘丽萍,徐岚,李薇薇,等. 8起副溶血性弧菌食物中毒分子流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(1): 9-13.
- [2] 贾华云,王岚,陈帅,等. 2010—2013年湖南省市售水产品中副溶血性弧菌污染状况及病原特征分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(12): 1433-1435.
- [3] 胡伟昭. 副溶血弧菌:分子分型与主要耐药基因双重PCR检测[D]. 杭州:浙江大学, 2010.
- [4] 吴莹,刘军,王银平,等. 淄博市300份市售动物性水产品中主要致病性弧菌毒力基因检测[J]. 现代预防医学, 2019,

46(12):2167-2170.

- [5] 叶灵琼,陈万义,刘卫兵,等. 副溶血弧菌耐药谱及其对头孢类药物抗性分析[J]. 中国食品学报, 2011, 11(7): 157-162.
- [6] 韩海红,李凤琴,徐进,等. 2013年中国三省贝类及环境中副溶血性弧菌分离株耐药特征分析[J]. 卫生研究, 2015, 44(3): 382-386.
- [7] 中华人民共和国国家和卫生计生委. 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] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S29 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing nineteenth informational supplement [S]. Wayne, PA: CISI, 2019.
- [9] 黄彦,王红,孙贵娟,等. 一起食物中毒副溶血性弧菌血清及PFGE分型[J]. 应用预防医学, 2013(1): 9-12.
- [10] ROCOURT J, MOY G, VIERK K, et al. The present state of foodborne disease in OECD countries [M]. Geneva: WHO, 2003.
- [11] 吴莹. 2013年—2016年淄博市副溶血性弧菌血清分型、分子特征及溯源研究[D]. 青岛:青岛大学, 2017.
- [12] 李丽倩,姚琳,林才云,等. 2018年贝类来源副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(4): 364-370.
- [13] 张德福,付绪磊,张明,等. 副溶血性弧菌毒力因子及致病机理的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 216-222.
- [14] 江艳华,姚琳,李君,等. 养殖海水贝类中副溶血性弧菌的致病性及耐药性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3474-3479.
- [15] 李薇薇,王晓英,裴晓燕,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): 374-380.