

调查研究

2019—2020年枣庄市副溶血性弧菌病人分离株的
耐药性、毒力基因及分子分型分析

李会会,吴修凤,张涛

(枣庄市疾病预防控制中心,山东 枣庄 277100)

摘要:目的 了解枣庄市2019—2020年副溶血性弧菌(VP)病人分离株的耐药性、毒力基因携带情况和分子分型特征。方法 参照GB4789.7—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》进行VP菌株的分离和鉴定,采用微量肉汤稀释法测定VP分离株对12种抗生素的耐药性,利用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)技术检测VP分离株的毒力基因(*tlh*、*tdh*、*trh*),使用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对分离株进行分子分型检测,并进行聚类分析。采用 χ^2 检验对结果进行统计分析。结果 678份病人粪便标本中VP的检出率为4.57%,31株VP分离株对头孢唑啉耐药率为58.06%,多重耐药率为12.90%,其毒力基因*tlh*、*tdh*、*trh*的携带率分别为100%、96.78%、3.22%。31株VP分为17个带型,2个带型簇,优势带型簇涵盖了93.55%的菌株。结论 枣庄市VP病人分离株对头孢唑啉有较高耐药率,出现了多重耐药株。携带的主要毒力基因为*tdh*和*tlh*。PFGE带型集中、同源性强,提示应加强该地区VP的流行病学调查和溯源工作。

关键词:副溶血性弧菌;药敏试验;毒力基因;分子分型

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)05-0591-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.05.013

Analysis of the drug resistance, virulence gene and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* identified from patients in Zaozhuang City, 2019-2020

LI Huihui, WU Xiufeng, ZHANG Tao

(Zaozhuang Center for Disease Control and Prevention, Shandong Zaozhuang 277100, China)

Abstract: Objective The study aims to analyze the drug resistance, virulence genes and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) identified in Zaozhuang from 2019 to 2020. **Methods** The VP strains were isolated and identified, following the *Vibrio parahaemolyticus* test protocol in the National Food Safety Standard (GB 4789.7—2013). The broth microdilution method was performed to determine the resistance of VP to 12 antibiotics. Their virulence genes (*tlh*, *tdh*, *trh*) were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was applied for molecular typing, and the strain clustering was analyzed by BN software. The chi-square test was used to analyze the statistical result ($\alpha=0.05$). **Results** The detection rate of VP was 4.57% out of 678 patients' stool samples. Among the 31 identified VP strains, the resistance rate to cefazolin was 58.06%, and the multi-drug resistance rate was 12.90%. The positive rates of virulence genes *tlh*, *tdh*, *trh* were 100%, 96.78%, 3.22% respectively. The 31 VP strains were further divided into 17 band types and 2 band clusters. The dominant band type cluster covered 93.55% of the strains. **Conclusion** The VP strains in Zaozhuang from 2019 to 2020 were highly resistant to cefazolin. Some strains showed multiple drug resistance. They mainly carry two virulence genes, *tdh* and *tlh*. The PFGE bands were well-clustered, suggesting high homology among these VP strains. Epidemiological investigation and tracing of VP strains should be strengthened in this region.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; drug sensitive test; virulence gene; molecular typing

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是我国沿海地区引起食源性疾病暴发和急性感染性腹泻的主要病原体之一^[1-3],以腹痛、腹泻、呕吐及

水样便为主要症状,已成为引起我国食源性疾病暴发的首要致病菌^[4-5]。通过食源性疾病监测报告系统,发现枣庄2019—2020年检出的食源性致病菌以VP菌株为主。为研究枣庄地区的食源性VP菌株耐药特性、毒力基因携带状况和脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)分子分型特

收稿日期:2021-02-19

作者简介:李会会 女 微生物检验主管技师 研究方向为病原微生物检测 E-mail:zxcdelhh@163.com

征,对分离自食源性疾病病人粪便标本的 VP 分离株开展分子生物学检测,为规范临床治疗抗生素的使用和防控食源性疾病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

VP 菌株分离自枣庄市食源性疾病主动监测哨点医院 2019—2020 年食源性疾病患者粪便。PFGE Marker 标准菌株沙门菌 H9812 和药敏质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 由山东省疾病预防控制中心提供。

1.1.2 主要试剂及仪器

营养琼脂、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、半固体琼脂、3%NaCl 半固体琼脂购自北京陆桥技术股份有限公司,脑心浸液琼脂 BHA 购自英国 OXOID 公司,副溶血性弧菌(TRH\TDH\TLH)三重核酸检测试剂盒购自深圳生科源生物股份有限公司,革兰氏阴性需氧菌药敏检测板购自上海星佰生物技术有限公司,内切酶 *Xba* I 和 *Sfi* I 购自日本 TaKaRa 公司,SeaKem Gold Agarose 购自瑞士 Lonza 公司,蛋白酶 K 购自美国 MERCK 公司,GelRed 购自美国 Biotium 公司,1 mol/L Tris-HCl、0.5 mol/L EDTA 和 5×TBE 缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司,比浊仪、全自动细菌鉴定仪 VITEK2 及配套鉴定卡片购自法国梅里埃公司,QuantStudio5 荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司,PFGE 电泳及成像系统购自美国 BIO-RAD 公司,以上试剂均经过验收合格后在有效期内使用,仪器经过检定校准合格后投入使用。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离

参照《山东省食源性疾病主动监测工作手册》^[6]和 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]采集符合病例定义的食源性疾病病人粪便标本并进行 VP 菌株的分离和鉴定,粪便标本增菌培养后接种 VP 显色培养基,选取可疑菌落(淡紫色)进行生化鉴定,将 VP 阳性菌株保存于半固体培养基。利用生化鉴定和 VITEK 2 全自动细菌鉴定仪对疑似 VP 菌株进行复核鉴定后进行药敏试验、毒力基因检测和脉冲场凝胶电泳。

1.2.2 药敏试验

采用微量肉汤法进行药物敏感性试验,根据革兰氏阴性需氧菌药敏检测板使用说明书并结合菌落特性,将菌悬液调至 0.48~0.7 麦氏浊度,接种至药

敏板,经过 35℃ 孵育 24 h 后,根据反应孔的颜色肉眼判读得出数据,其中蓝色、蓝紫色和紫色判为阴性,玫红色和粉红色判为阳性。使用大肠埃希菌 ATCC25922 进行质控。根据美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准^[8]判定 VP 对以下 12 种抗生素的敏感(S)、中度敏感(I)和耐药(R)结果:环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、氯霉素(Chloramphenicol, CHL)、四环素(Tetracycline, TET)、庆大霉素(Gentamicin, GEN)、头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)、头孢西丁(Cefoxitin, CFX)、头孢他啶(Ceftazidime, CAZ)、头孢唑啉(Cefazolin, CFZ)、氨苄西林(Ampicillin, AMP)、氨苄西林-舒巴坦(Ampicillin-sulbactam, AMS)、亚胺培南(Imipenem, IMP)、复方磺胺(Compound sulfa, SXT)。

1.2.3 毒力基因检测

使用荧光定量聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)法对 VP 进行毒力基因检测,选取新鲜培养的 VP 菌落,使用副溶血性弧菌三重核酸检测试剂盒,对毒力基因 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 进行检测,PCR 的条件参考产品说明书。

1.2.4 脉冲场凝胶电泳

参照《山东省食源性疾病主动监测工作手册》^[6]对 VP 分离株进行 PFGE 分子分型试验,Marker 标准菌株沙门菌 H9812 用限制性内切酶 *Xba* I 酶切 2.5 h,VP 分离株使用限制性内切酶 *Sfi* I 酶切 4 h,电泳参数为:Low MW:78 kb,High MW:396 kb,Run time:17.5 h,Initial switch time = 10 s,Final switch time = 35 s,初始电流为 120 mA。电泳结束后使用 GelRed 染色 30 min,超纯水脱色 30 min,用凝胶成像系统进行图像拍摄,结果采用 BioNumerics 7.6 软件聚类分析,优化百分比和条带位置差异容许度均为 1.5%,带型相似度大于 85% 判定为一个带型簇^[9]。

1.2.5 统计学分析

数据管理采用 Excel 2007,使用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,用 χ^2 检验比较各组之间差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株分离情况

从 678 份符合病例定义的食源性疾病病人粪便样本中分离出沙门菌(12 株)、志贺菌(2 株)、致泻性大肠埃希菌(0 株)、VP(31 株)和诺如病毒(41 株)共 86 株,检出率为 12.68%,其中分离出 31 株 VP 菌株,检出率为 4.57%。

2.2 药敏试验结果

31 株 VP 分离株对头孢唑啉的耐药率达到 58.06% (18/31), 对氨苄西林和头孢西丁的耐药率分别为 16.13% (5/31) 和 12.90% (4/31), 其中有

4 株 VP 对 3 种以上的抗生素同时耐药, 多重耐药率为 12.90% (4/31)。多重耐药菌中有 3 株同时耐受四环素、头孢唑啉和复方磺胺 (TET-CFZ-SXT), 占多重耐药菌的 75% (3/4)。见表 1。

表 1 31 株 VP 菌株对抗生素的耐药情况

Table 1 Results of drug resistance analysis of 31 strains of VP

抗生素种类	名称	缩写	敏感 (S)	中度敏感 (I)	耐药 (R)	耐药率/%
青霉素类	氨苄西林	AMP	23	3	5	16.13
	氨苄西林-舒巴坦	AMS	31	0	0	0.00
头孢类	头孢他啶	CAZ	26	1	4	12.90
	头孢噻肟	CTX	28	1	2	6.45
	头孢唑啉	CFZ	2	11	18	58.06
碳青霉烯类	亚胺培南	IMP	31	0	0	0.00
四环素类	四环素	TET	28	0	3	9.68
β 内酰胺类	头孢西丁	CFX	27	0	4	12.90
氯霉素类	氯霉素	CHL	30	0	1	3.23
氨基糖苷类	庆大霉素	GEN	29	1	1	3.23
磺胺类	复方磺胺	SXT	28	0	3	9.68
喹诺酮类	环丙沙星	CIP	31	0	0	0.00

2.3 毒力基因携带情况

31 株 VP 分离株的 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 毒力基因携带率分别为 100% (31/31)、96.77% (30/31) 和 3.23% (1/31), 其中 96.77% (30/31) 的 VP 为 *tlh*⁺ *tdh*⁺ *trh*⁻ 菌株, 仅有 3.23% (1/31) 的 VP 为 *tlh*⁺ *tdh*⁻ *trh*⁺ 菌株。

似度为标准可以分为 17 个带型, 编号为 F1~F17, 其中 F12 有 6 株菌同源性达到 100%, F9 有 5 株菌同源性达到 100%。按照条带相似度大于 85% 为标准^[9] 可以分为 2 个带型簇, 优势带型簇涵盖了 93.55% (29/31) 的菌株 (图 1)。

2.4 PFGE 分子分型结果

31 株 VP 分离株的脉冲场凝胶电泳带型相似度为 69.9%~100%, 具有较高的相似性, 按照 100% 相

3 讨论

VP 自 1950 年被日本学者藤野恒三郎发现以来^[10], 已在全球范围广泛流行, 是引起食源性疾

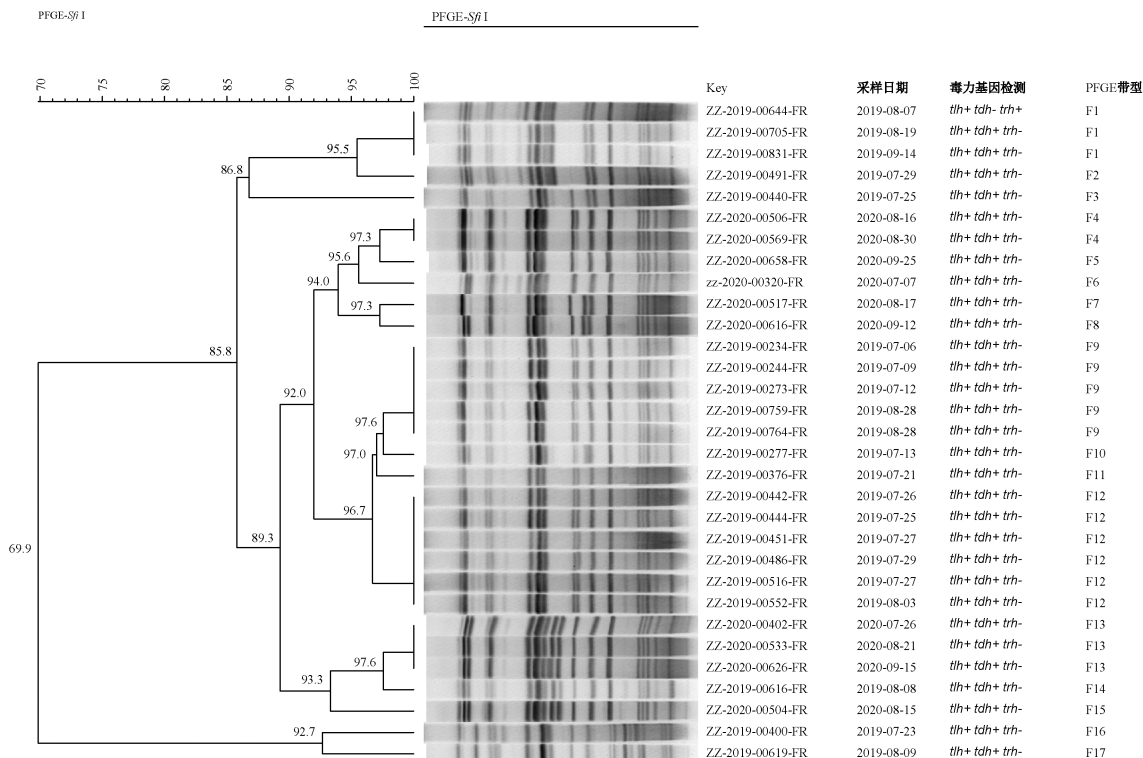


图 1 31 株 VP 的 PFGE 聚类分析图

Figure 1 Cluster analysis of PFGE patterns of 31 strains of VP

事件的主要致病菌。VP 可产生耐热直接溶血素 (Thermostable direct hemolyticus, TDH)、耐热相关溶血素 (Tdh-related hemolysin, TRH) 和不耐热溶血素 (Thermolabile hemolysin, TLH), 分别由 *tdh*、*trh* 和 *tlh* 基因编码, TDH 和 TRH 被认为是主要的致病因子^[11], 其中 TDH 直接作用于红细胞, 具有溶血活性、肠毒素活性、心脏毒性和细胞毒性^[12]。

研究结果表明, 枣庄市 2019—2020 年食源性病原体检出率为 12.68%, 其中 VP 的检出率为 4.57%, 高于中国东部地区 3.2% 的检出率^[13], 成为枣庄地区首要食源性致病菌。*tlh* 作为 VP 的种特异性基因, 其携带率为 100%, 和生化鉴定结果相互印证。*tdh* 毒力基因携带率为 96.77%, *trh* 为 3.23%, *tlh*⁺ *tdh*⁺ *trh*⁻ 为枣庄地区优势基因型, 与北京地区的报道一致^[14]。

抗生素是治疗 VP 感染^[15] 的主要方法, 滥用抗生素不仅会干扰有益微生物群, 影响免疫功能, 还会造成菌株耐药^[16], 因此研究 VP 的毒力基因携带和耐药状况, 对了解其致病性和指导抗生素治疗有十分重要的意义。本文对 31 株 VP 进行了药物敏感性试验, 发现对头孢唑啉普遍耐药 (58.06%), 部分菌株对氨苄西林 (16.13%) 和头孢西丁 (12.90%) 产生耐药, 更是出现了多重耐药 (12.90%) 的情况, 建议临床医生在治疗 VP 性腹泻时尽量避免上述抗生素的使用, 选择使用氨苄西林-舒巴坦、亚胺培南和环丙沙星等药物敏感性高的抗生素。

PFGE 是分离大片段 DNA 的分子生物学分型方法, 是国际公认的食源性传染病暴发流行确认的重要手段^[17-18], 被广泛应用于细菌的分子流行病学研究中。PFGE 能够用于分析菌株之间的相关性, 识别暴发和追踪溯源, 在疫情控制方面可发挥重要的作用^[19]。通过 PFGE 分子分型和聚类分析, 发现本地区近两年分离的 VP 的 PFGE 带型相似度为 69.9%~100%, 带型集中、同源性高, 93.55% 的 VP 带型为优势带型簇, F9 和 F12 是枣庄地区 2019 年流行的主要带型, 存在时间和地域的聚集性, F4~F8 和 F13 是 2020 年流行的主要带型, 它们之间的同源性达到 89.4%。从分子流行病学的层面提示了枣庄地区存在特定的 VP 流行菌株, 与王小龙等^[9]、沈月华等^[20] 和刘文娟等^[21] 研究的当地 VP 菌株带型特点 (带型分散, 没有优势带型, 呈现多态性) 明显不同。说明枣庄市食源性疾病患者粪便中 VP 菌株来源相近, 应进一步加强食品中 VP 污染状况的监测, 并结合流行病学调查资料进行追踪溯源, 掌握污染源, 采取干预措施, 降低 VP 导致的食源性疾

病的发生。

参考文献

- [1] 钟凌, 蔡茂荣, 张丽蓉, 等. 漳州市食源性副溶血性弧菌生物学和分子流行病学特征分析 [J]. 预防医学情报杂志, 2020, 36(12): 1616-1620+1628.
- [2] JIANG Y H, CHU Y B, XIE G S, et al. Antimicrobial resistance, virulence and genetic relationship of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from coasts of Bohai Sea and Yellow Sea, China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 290: 116-124.
- [3] 于颖慧, 夏威, 施惠军, 等. 2017—2018 年江苏省张家港市食源性疾病主动监测结果分析 [J]. 医学动物防制, 2020, 36(5): 498-501.
- [4] 毛雪丹. 2003-2008 年我国细菌性食源性疾病流行病学特征及疾病负担研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2010.
- [5] 陈星. 副溶血弧菌毒力基因的表达变化研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- [6] 山东省疾病预防控制中心. 山东省食源性疾病主动监测工作手册 [Z]. 2019.
- [7] 中华人民共和国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: GB4789.7—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [8] CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. CLSI supplement M100 [S]. Melvin P: The Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [9] 王小龙, 张梦寒, 朱莉勤, 等. 2016—2019 苏州市副溶血性弧菌的毒力基因和耐药性及分子分型研究 [J]. 现代预防医学, 2020, 47(21): 3975-3980.
- [10] SHINODA S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections [J]. Biocontrol Science, 2011, 16(4): 129-137.
- [11] BAKER-AUSTIN C, STOCKLEY L, RANGDALE R, et al. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective [J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(1): 7-18.
- [12] LI L Z, MENG H M, GU D, et al. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis [J]. Microbiological Research, 2019, 222: 43-51.
- [13] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌发病率 [J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(3): 265-267.
- [14] 严寒秋, 张新, 黄瑛, 等. 2011—2014 年北京市副溶血性弧菌血清型及毒力基因特征分析 [J]. 现代预防医学, 2015, 42(24): 4468-4470+4517.
- [15] LETCHUMANAN V, YIN W F, LEE L H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(33): 33.
- [16] LANGDON A, CROOK N, DANTAS G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation [J]. Genome Medicine, 2016, 8(1): 39.
- [17] 王丽丽, 徐建国. 脉冲场凝胶电泳技术 (PFGE) 在分子分型中的应用现状 [J]. 疾病监测, 2006, 21(5): 276-279.

- [18] GERNER-SMIDT P, KINCAID J, KUBOTA K, et al. Molecular surveillance of shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 by PulseNet USA[J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(9): 1926-1931.
- [19] SWAMINATHAN B, BARRETT T J, HUNTER S B, et al. PulseNet; the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, 7(3): 382-389.
- [20] 沈月华, 严伟, 朱晓娟, 等. 65株副溶血性弧菌分子分型及耐药特征分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020, 30(8): 931-933+940.
- [21] 刘文娟, 宋燕, 徐迎春, 等. 烟台地区食源性疾病中副溶血性弧菌的病原特征及溯源分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(9): 2986-2991.

调查研究

一起由肠炎沙门菌引起的学校食源性疾病暴发调查分析

萧松建¹, 吴燕飞², 刘东妹³, 方艳梅¹, 阮峰¹

(1. 珠海市疾病预防控制中心, 广东 珠海 519000; 2. 光明区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518107; 3. 佛冈县疾病预防控制中心, 广东 清远 511600)

摘要:目的 查明引起某学校食源性疾病暴发的可疑食品、致病因子和危险因素,为今后类似事件的防控和调查提供参考依据。方法 通过描述性流行病学方法分析病例的临床特征、流行病学特征及相关危险因素,开展病例对照研究,确定可疑餐次及食物,采集病例和厨工肛拭子、留样食物及环境样本进行病原学检测,采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对沙门菌分离株进行分型分析。结果 共搜索到病例74例,患病率为1.9%,临床症状主要为腹泻(83.8%)、腹痛(78.4%)、发热(63.5%)等。流行曲线为间歇性同源暴露,病例班级和宿舍分布无明显聚集性。病例对照研究结果显示在第二饭堂滑蛋饭窗口打餐是危险因素(10月8日OR=7.00,95%CI:1.51~32.48;10月9日OR=262.50,95%CI:22.21~3102.06)。共采集76份样本,其中12份样本分离培养出肠炎沙门菌,经PFGE图谱分析为2种带型,相似度95.7%。结论 本次事件为一起由肠炎沙门菌引起的食源性疾病暴发,可疑食品为滑蛋饭,应加强学校等集体单位食品卫生监管工作,蛋类食物应彻底煮熟煮透。

关键词:沙门菌;食源性疾病暴发;调查;学校;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)05-0595-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.05.014

Investigation and analysis of foodborne disease outbreak in a school caused by *Salmonella enteritidis*

XIAO Songjian¹, WU Yanfei², LIU Dongmei³, FANG Yanmei¹, RUAN Feng¹

(1. Zhuhai Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhuhai 519000, China;
2. Guangming District Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518107, China;
3. Fogang County Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Qingyuan 511600, China)

Abstract: Objective To identify the suspected food, pathogenic factors and risk factors of the foodborne disease outbreak in a school, and to provide reference for the prevention, control and investigation of similar events in the future.

Methods Descriptive epidemiological method were used to analyze the clinical characteristics, epidemiological characteristics and related risk factors of the cases. Suspicious meals and food were identified by case-control study. Samples such as anal swabs of cases and kitchen workers, reserved food and environment were collected for etiological detection. *Salmonella* isolates were classified by pulsed field gel electrophoresis. **Results** A total of 74 cases were found, with an incidence rate of 1.9%. The main clinical symptoms were diarrhea (83.8%), abdominal pain (78.4%) and fever (63.5%). The prevalence curve showed intermittent homologous exposure, and the distribution of cases in classes and dormitories showed no obvious aggregation. Results of a case-control study showed the risk factor was the rice with

收稿日期:2021-07-21

基金项目:珠海市医学科研基金项目(20171009A010009)

作者简介:萧松建 男 副主任医师 研究方向为急性传染病控制 E-mail:94027441@qq.com

通信作者:阮峰 男 主任医师 研究方向为急性传染病控制 E-mail:536483186@qq.com