

食源性疾病

北京一起副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌共感染导致急性胃肠炎暴发事件病原检测分析

康颖^{1,2}, 乔胜鑫^{1,3}, 闫爱霞^{1,2}, 赵文轩⁴, 崔尧⁴, 李首飞^{1,2}, 王苗^{1,2}, 王园园^{1,2}, 王洛桐^{1,2}, 李颖^{1,2}, 逢波^{2,4}

(1. 北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300; 2. 北京市顺义区疾病预防控制中心微生物感染性疾病检测工作站, 北京 101300; 3. 河北北方学院, 河北张家口 075000; 4. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206)

摘要:目的 对一起副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌共感染导致急性胃肠炎暴发事件进行实验室病原学分析。方法 采用实时荧光 PCR 方法对 4 个病例肛拭子、12 件可疑污染食品和 8 件环境涂抹的增菌液进行多种腹泻病原检测, 将副溶血性弧菌和霍乱弧菌分离培养, 并对分离株进行全基因组测序, 获取菌株毒力基因和耐药基因, 基于核心基因组单核苷酸多态性构建聚类树。结果 4 件病例肛拭子增菌液荧光 PCR 检测副溶血性弧菌结果均为 *toxR_{vp}+tdh+trh-*, 其中 2 件肛拭子荧光 PCR 检测霍乱弧菌结果为阳性。病例肛拭子副溶血性弧菌培养法检出率为 100% (4/4), 分离株均为 *toxR_{vp}+tdh+trh-*, 血清型均为 O4:KUT; 病例肛拭子霍乱弧菌培养法检出率为 50% (2/4), 均为非 O1/O139 血清型, 其中 1 分离株为 *toxR_{vc}+ctx-1t3ss+*。可疑污染食品副溶血性弧菌培养法检出率为 66.67% (8/12), 环境涂抹副溶血性弧菌检出率为 12.50% (1/8), 可疑污染食品和环境副溶血性弧菌分离株均为 *toxR_{vp}+tdh+trh-*; 可疑污染食品霍乱弧菌检出率为 25.00% (3/12), 分离株均为 *toxR_{vc}+ctx-1t3ss-*。基于病例、可疑污染食品和环境分离副溶血性弧菌形成 10 个相互独立且遗传距离较远的分支, 全部病例分离株处在同一分支, 为高度克隆化分支。分离自 2 个病例和 3 件可疑污染食品的霍乱弧菌分离株形成 5 个相互独立且遗传距离较远的分支。结论 本次暴发事件由副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌共感染导致; 弧菌共感染暴发事件中应加强多病原荧光 PCR 的辅助检测和菌株基因组特征分析, 优化弧菌优化培养路径。

关键词:急性胃肠炎; 暴发; 副溶血性弧菌; 非 O1/O139 霍乱弧菌; 实时荧光 PCR; 基因组测序; 食源性致病菌

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2024)01-0093-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.01.016

Etiology analysis of an acute gastroenteritis outbreak caused by co-infection with *Vibrio parahaemolyticus* and non-O1/O139 *Vibrio cholerae*

KANG Ying^{1,2}, QIAO Shengxin^{1,3}, YAN Aixia^{1,2}, ZHAO Wenxuan⁴, CUI Yao⁴, LI Shoufei^{1,2},
WANG Miao^{1,2}, WANG Yuanyuan^{1,2}, WANG Luotong^{1,2}, LI Ying^{1,2}, PANG Bo^{2,4}

(1. Beijing Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China; 2. Workstation for Microbial Infectious Disease, Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China; 3. Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China; 4. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To analyze an acute gastroenteritis outbreak caused by co-infection with *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) and non-O1/O139 *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*). **Methods** Four anal swabs, 12 food samples, and 8 environmental samples enriched in liquid culture media were subjected to pathogen screening with real-time PCR. *V. parahaemolyticus* and *V. cholerae* strains isolated were subjected to whole genome sequencing, and virulence and antibiotic resistance genes were screened. Cladograms were constructed based on core genome single nucleotide polymorphisms. **Results** *V. parahaemolyticus* strains were detected in anal swab samples with real-time PCR that were

收稿日期:2023-04-13

基金项目:基于病原细菌基因组的传染病网络化监测技术体系研究(2018ZX10714-002-001)

作者简介:康颖 女 医师 研究方向为食源性疾病研究工作 E-mail:ky18810295296@163.com

通信作者:逢波 男 研究员 研究方向为病原细菌基因组学、病原细菌致病机制 E-mail:pangbo@icdc.cn

toxR_{VP}+tdh+trh-, and two of them were positive for *V. cholerae*. The positive rate of *V. parahaemolyticus* in the anal swab samples was 100% (4/4), the isolates were *toxR_{VP}+tdh+trh-*, and their serotype was O4:KUT. The positive rate of *V. cholerae* culture in the anal swabs of patients was 50% (2/4). The serogroup of the isolates was non-O1/O139, and one of them was *toxR_{VC}+ctx/t3ss+*. The positive rate of *V. parahaemolyticus* in the food samples was 66.67% (8/12), and that in the environment samples was 12.50% (1/8). The strains isolated from food and environmental samples were *toxR_{VP}+tdh+trh-*. The positive rate of *V. cholerae* culture in the food samples was 25.00% (3/12) and the isolated strains were *toxR_{VC}+ctx/t3ss-*. The *V. parahaemolyticus* strains isolated from patient, food, and environment samples formed 10 distinct lineages. The four patient isolates were highly clonal. The *V. cholerae* strains isolated from two patients and three food samples formed five distinct lineages. **Conclusion** The outbreak was caused by co-infection with *V. parahaemolyticus* and non-O1/O139 *V. cholerae*. Real-time PCR and whole-genome sequence analysis of strains should be performed in the detection and analysis of outbreaks caused by vibrio co-infection. Additionally, optimization of vibrio culture pathways is recommended.

Key words: Acute gastroenteritis; outbreak; *Vibrio parahaemolyticus*; non-O1/O139 *Vibrio cholerae*; real-time PCR; whole-genome sequencing; foodborne pathogenic

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种嗜盐性革兰氏阴性菌,广泛存在于海产品中,能够引起急性胃肠炎甚至败血症等,是一种重要的食源性病原菌^[1-2]。李雪原等^[3]的研究表明,近几年,中国大陆生熟交叉污染导致食源性疾病暴发事件中,副溶血性弧菌为首位致病微生物;北京市食源性疾病暴发事件中由副溶血性弧菌引起的暴发数量最多,且与海产品交叉污染高度相关。近些年来,流行菌株的优势血清型多为 O3:K6、O4:KUT 等,多数携带毒力基因 *tdh*^[4-8]。

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*, VC)是弧菌属中重要的致病菌,霍乱诊断标准(WS 289—2008)中规定甲类传染病霍乱确诊需要满足病例标本中分离到 O1 和(或)O139 群霍乱弧菌,霍乱毒素(Cholera toxin)是霍乱弧菌最重要的致病因子,可通过检测霍乱毒素基因(*ctx*)进行识别鉴定^[9]。以往研究认为非 O1/O139 群霍乱弧菌仅引起散在的轻度腹泻^[10],但近些年持续发现由非 O1/O139 群霍乱弧菌导致的腹泻病例^[11-12],亦有其导致暴发的相关报道^[13-14],本地区腹泻监测中也分离到非 O1/O139 群霍乱弧菌,其主要携带 III 型分泌系统(Type three secretion system, TTSS)^[15]。

1998 年曾从腹泻患儿粪便中分离到副溶血性弧菌和小川型霍乱弧菌,天津曾发生一起由副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌导致的食物中毒事件,但仅进行了生化实验和血清学鉴定,都没有对分离到的菌株进行基因组学分析,也未对检验流程进行优化。本研究基于一同由副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌共感染导致的食源性疾病暴发事件的检测分析,基于荧光 PCR 方法辅助上述 2 种弧菌的分离和鉴定,优化检测流程,避免非 O1/O139 霍乱弧菌漏检,并对不同来源菌株进行基因组

学分析。本研究为多种致病性弧菌共感染导致暴发事件实验室应对提供经验。

1 材料与方法

1.1 流行病学调查和样品采集

本次暴发事件发生在一家自助烤肉餐厅,其中含海鲜食材。来自 3 个不同家庭的 6 人在餐厅用餐后出现腹痛、呕吐、腹泻等急性胃肠炎症状并到医院就诊。各症状出现频率分别为腹痛(100%, 6/6)、呕吐(100%, 6/6)、腹泻(66.67%, 4/6),病例潜伏期介于 8~16 h 之间。4 名病例配合调查人员采集到肛拭子样品(命名为 P1~P4),并使用 Cary-Blair 运送培养基保存;采集自助餐厅中与病例暴露餐次相关剩余食品 12 件(命名为 F1~F12),以及环境涂抹 8 件(命名为 S1~S8)。所有样品采集过程均符合操作规范,并在 4 °C 环境下运送至区疾控中心进行病原学检测。

1.2 主要仪器与试剂

实时荧光 PCR 仪(美国伯乐公司), VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃公司),基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(德国布鲁克公司),二代测序仪(美国 Illumina HiSeq2500 平台)。

Cary-Blair 运送培养基(青岛海博生物技术有限公司),弧菌显色培养基(法国科玛嘉公司),3% 氯化钠碱性蛋白胨水、碱性蛋白胨水(北京陆桥生物技术有限公司),副溶血性弧菌诊断血清(日本生研公司),副溶血性弧菌荧光 PCR 检测试剂盒(*toxR_{VP}*、*tdh*、*trh*)、霍乱弧菌荧光 PCR 检测试剂盒(*toxR_{VC}*)、24 种食源性致病菌荧光 PCR 检测试剂盒、5 种腹泻病毒荧光 PCR 检测试剂盒(北京卓诚惠生生物科技股份有限公司),核酸提取试剂盒(江苏硕世公司)。

1.3 方法

1.3.1 细菌分离培养

在保存病例肛拭子的 Cary-Blair 培养基中加入 2 mL 生理盐水并充分震碎混匀,取 200 μ L 混匀液体分别加入 2 种弧菌增菌液(3% 氯化钠碱性蛋白胨水和氯化钠碱性蛋白胨水),37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,环境涂抹样品增菌方式与病例肛拭子一致;可疑污染食品样品取 25 g 也分别加入 225 mL 上述 2 种弧菌增菌液,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。病例肛拭子、环境涂抹和可疑污染食品在使用 2 种不同的弧菌增菌液后均取 1 环接种弧菌显色平板,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,每个样品的分离平板均分别挑取疑似副溶血性弧菌和霍乱弧菌进行飞行质谱检测,鉴定为上述副溶血性弧菌和霍乱弧菌的菌落接种平板纯化并使用全自动细菌鉴定仪进行系统生化鉴定。其他食源性致病菌均参照各自的培养方法进行分离培养。

1.3.2 荧光 PCR 检测

将经过 24 h 增菌的 2 种弧菌增菌液分别提取细菌 DNA 进行霍乱弧菌(*toxR_{VC}*)和副溶血性弧菌(*toxR_{VP}*、*tdh*、*trh*)荧光 PCR 检测,检测方法参照产品说明书。对分离的副溶血性弧菌和霍乱弧菌株也提取 DNA 进行相同产品荧光 PCR 检测。

1.3.3 菌株全基因组测序

提取病例、食品、环境分离副溶血性弧菌和霍乱弧菌 DNA,进行细菌全基因组框架图测序,下机

数据使用软件 FastQC 和 Trimmomatic 进行质量评估,使用软件 SPAdes、GapFiller 和 PrInSeS-G 对质控后的数据进行拼接和序列矫正。用 BLAST 将拼接好的序列与 VFDB(Virulence factors of pathogenic bacteria)数据库和 CARD(The comprehensive antibiotic resistance database)数据库进行比对得到耐药基因和毒力因子的注释结果。用软件 FastANI 比对序列间的平均核苷酸一致性(Average nucleotide identity, ANI),使用 MUMmer、SAMtools 等软件进行序列比对并获取单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNP)。

2 结果

2.1 增菌液荧光 PCR 结果

4 个病例肛拭子使用 2 种弧菌增菌液检测副溶血性弧菌结果均为 *toxR_{VP}*+/*tdh*+/*trh*-,其中 2 件(P3 和 P4)霍乱弧菌检测结果阳性(*toxR_{VC}*+)。可疑食品样品基于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌后,11 件副溶血性弧菌检测结果阳性(其中 10 件为 *toxR_{VP}*+/*tdh*-/*trh*-,1 件为 *toxR_{VP}*+/*tdh*+/*trh*-),2 件为霍乱弧菌阳性(*toxR_{VC}*+)。可疑食品样品基于碱性蛋白胨水增菌后,9 件为副溶血性弧菌阳性(*toxR_{VP}*+/*tdh*-/*trh*-),3 件为霍乱弧菌阳性(*toxR_{VC}*+)。1 件环境涂抹使用 2 种增菌液均检测副溶血性弧菌阳性(*toxR_{VP}*+/*tdh*-/*trh*-)。所有样品荧光 PCR 检测结果及 Ct 值分布见表 1。

表 1 副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌增菌液荧光 PCR 检测和分离培养结果

Table 1 Result of strain isolation and real-time PCR based on enrichment culture

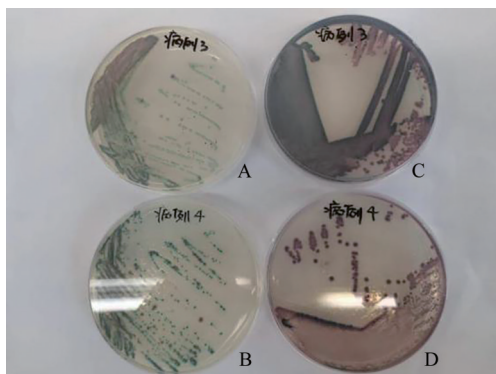
样品类型	样品编号	样品名称	增菌液荧光 PCR(Ct 值)						分离培养结果	
			3% 氯化钠碱性蛋白胨水			碱性蛋白胨水			VP(携带 <i>tdh</i> 基因)	VC(携带 <i>t3ss</i> 基因)
			<i>toxR_{VP}</i>	<i>tdh</i>	<i>toxR_{VC}</i>	<i>toxR_{VP}</i>	<i>tdh</i>	<i>toxR_{VC}</i>		
病例肛拭子	P1	病例 1 肛拭子	20.96	19.08	-	20.6	19.34	-	+(+)	-(/)
	P2	病例 2 肛拭子	20.06	19.21	-	22.62	20.7	-	+(+)	-(/)
	P3	病例 3 肛拭子	20.26	18.02	18.65	25.63	27.06	19.56	+(+)	+(+)
	P4	病例 4 肛拭子	19.86	17.65	22.76	25.30	23.27	21.31	+(+)	+(-)
可疑食品	F1	蚬尖(熟)	30.47	-	34.99	31.15	-	26.72	+(-)	+(-)
	F2	扇贝肉(熟)	27.31	-	-	33.3	-	-	+(-)	-(/)
	F3	鸡胗(熟)	26.24	-	24.04	29.99	-	22.88	+(-)	+(-)
	F4	凉拌鱼皮(熟)	29.01	37.73	-	39.38	-	-	+(-)	-(/)
	F5	鹌鹑蛋(熟)	31.83	-	-	-	-	27.73	-(/)	+(-)
	F6	拌海带(熟)	33.19	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	F7	青虾(生)	27.94	-	-	23.48	-	-	+(-)	-(/)
	F8	红虾(生)	27.64	-	-	41.29	-	-	+(-)	-(/)
	F9	扇贝肉(生)	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	F10	蛭子(生)	25.62	-	-	24.57	-	-	-(/)	-(/)
	F11	生蚝(生)	27.21	-	-	23.99	-	-	+(-)	-(/)
	F12	鸭脖(熟)	23.36	-	-	26.41	-	-	+(-)	-(/)
环境涂抹	S1	凉菜区案板	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	S2	拌菜盆	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	S3	冰箱门把手	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	S4	冰箱冰块	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	S5	制作寿司的案板	21.89	-	-	26.74	-	-	+(-)	-(/)
	S6	操作台面	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	S7	展台冰块	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)
	S8	活贝类	-	-	-	-	-	-	-(/)	-(/)

2.2 分离培养结果

病例肛拭子副溶血性弧菌检出率为 100%(4/4), 菌株均为 *toxR_{VP}+/tdh+/trh-*, 血清型均为 O4:KUT。病例肛拭子霍乱弧菌检出率为 50%(2/4), P3 分离菌株为 *toxR_{VC}+/ctx-/t3ss+*, P4 分离菌株为 *toxR_{VC}+/ctx-/t3ss-*, 均为非 O1/O139 血清型。4 个病例肛拭子分离培养结果和基于增菌液荧光 PCR 结果分布一致。

可疑污染食品副溶血性弧菌检出率为 66.67%(8/12), 菌株均为 *toxR_{VP}+/tdh-/trh-*, 其中 F5、F6、F10 增菌液荧光 PCR 结果为 *toxR_{VP}+/tdh-/trh-*, 但未分离到副溶血性弧菌; F4 增菌液荧光 PCR 结果为 *toxR_{VP}+/tdh+/trh-*, 但分离副溶血性弧菌菌株为 *toxR_{VP}+/tdh-/trh-*。可疑污染食品霍乱弧菌检出率为 25.00%(3/12), 菌株均为 *toxR_{VC}+/ctx-/t3ss-*, 检出阳性样品分布与荧光 PCR 阳性样品分布一致。

环境涂抹副溶血性弧菌检出率为 12.50%(1/8), 菌株均为 *toxR_{VP}+/tdh-/trh-*, 分离培养结果和荧光 PCR 结果分布一致。各样品分离培养结果见表 1, P3 和 P4 样品分离平板见图 1。



注: A 平板为 P3 基于碱性蛋白胨水增菌后分离培养, B 平板为 P4 基于碱性蛋白胨水增菌后分离培养, C 平板为 P3 基于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌后分离培养, D 平板为 P4 基于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌后分离培养; 霍乱弧菌在平板上呈蓝绿色菌落, 副溶血性弧菌在平板上呈紫红色菌落

图 1 基于不同增菌液接种弧菌显色平板上的生长状况

Figure 1 Growth status of strains on *Vibrio* Chromagar plate inoculated with different enrichment culture media

2.3 菌株全基因组测序结果

从 4 个病例分离培养平板中分别选取 1 个副溶血性弧菌单菌落 (P1-1-VP、P2-1-VP、P3-1-VP、P4-1-VP), 从 F7 分离培养中选取 1 个副溶血性弧菌单菌落 (F7-1-VP), 从 F1、F2、F3、F8、F11、F12、S5 中分别挑取 2 个副溶血性弧菌单菌落 (F1-1-VP、F1-2-VP、F2-1-VP、F2-2-VP、F3-1-VP、F3-2-VP、F4-1-VP、F4-2-VP、F8-1-VP、F8-2-VP、F11-1-VP、F11-2-VP、F12-1-VP、F12-2-VP、S5-1-VP、S5-2-VP), 基于上述 21 株副

溶血性弧菌全基因组非重复、非重组的核心基因组区域 SNP, 使用最大似然法构建聚类树。21 株副溶血性弧菌形成 10 个相互独立且遗传距离较远的分支, 其中 4 个病例分离株 (P1-1-VP、P2-1-VP、P3-1-VP、P4-1-VP) 之间未检测到 SNP。分离自同一件食品 (或环境) 的菌株均处在同一遗传分支, 9 件食品及环境样品 (F1、F2、F3、F7、F8、F11、F12、S5) 分离菌株分布在 9 个毒力且遗传距离较远的分支上 (图 2)。全部副溶血性弧菌分离株均携带耐药基因 *bla_{CARB}*, 食品 F8 分离株同时携带耐药基因 *qnrVC6*, 食品 F1 分离株同时携带耐药基因 *sul2* 和 *tet(59)* (图 2)。

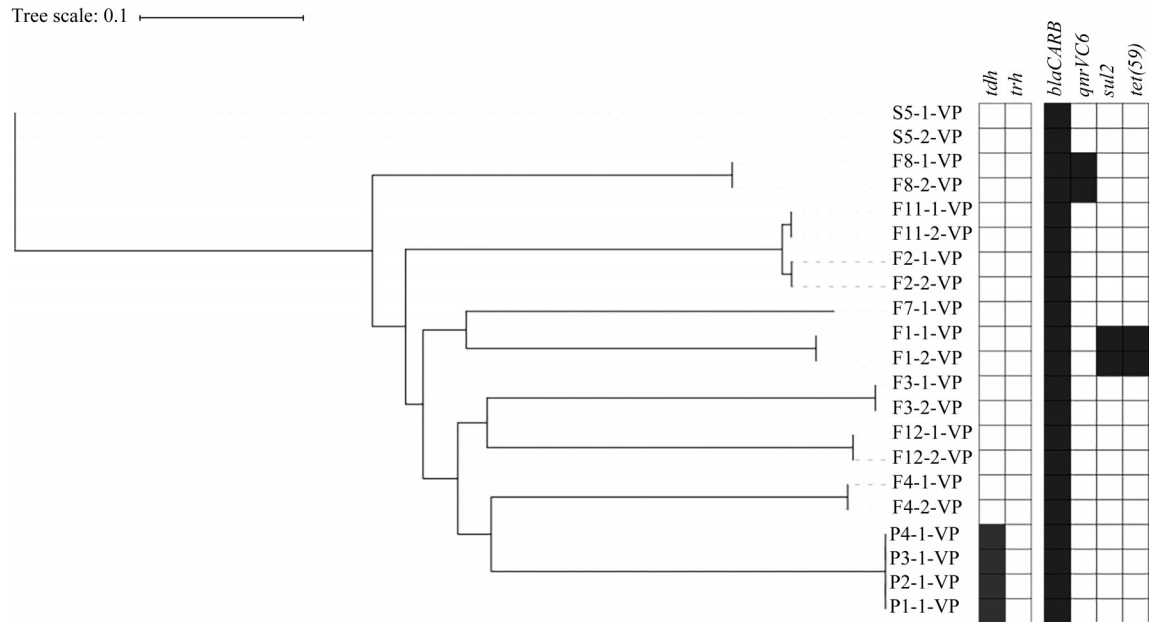
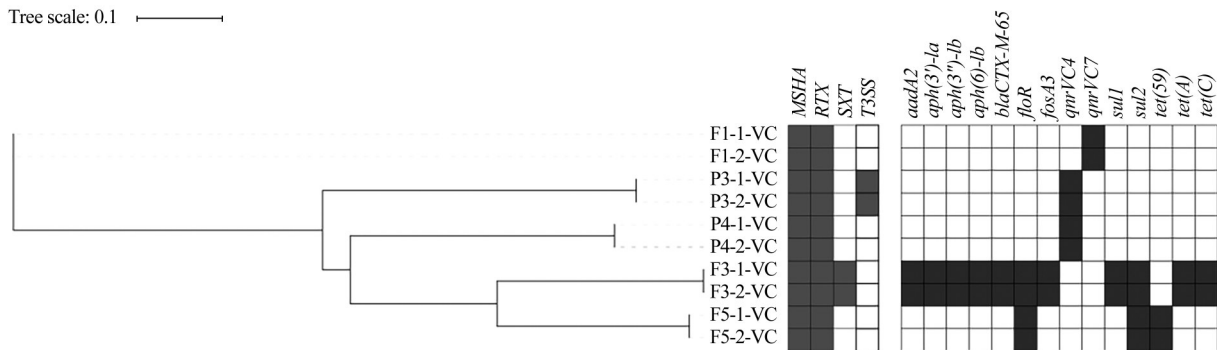
从 P3、P4、F1、F3、F5 分离培养平板中分别选取 2 个霍乱弧菌单菌落 (P3-1-VC、P3-2-VC、P4-1-VC、P4-2-VC、F1-1-VC、F1-2-VC、F3-1-VC、F3-2-VC、F5-1-VC、F5-2-VC), 基于上述 10 株霍乱弧菌全基因组非重复、非重组的核心基因组区域 SNP, 使用最大似然法构建聚类树。10 株霍乱弧菌形成 5 个相互独立且遗传距离较远的分支, 分离自同一样品的菌株均处在同一遗传分支, 见图 3。全部病例分离株均携带耐药基因 *qnrVC4*, 食品 F1 分离株携带耐药基因 *qnrVC7*, 食品 F5 分离株同时携带 3 种耐药基因, 食品 F3 分离株同时携带 11 种耐药基因, 见图 3。

3 讨论

本次暴发事件全部病例肛拭子均分离到 *tdh+*、血清型相同的高度克隆化副溶血性弧菌菌株, 2 名病例同时分离到非 O1/O139 霍乱弧菌, 且 1 名病例的分离株 *t3ss+*。综合本次暴发流行病学调查结果和实验室检测及分子分型结果, 可判定本次暴发事件由副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌共感染导致。

副溶血性弧菌导致的暴发中, O3:K6 为常见血清型^[16-17], 本地区 2014—2018 年由副溶血性弧菌导致的腹泻散发及暴发事件中均以 O3:K6 优势血清型^[18-20], 腹泻监测分离副溶血性弧菌中 O4:KUT 和 O10:K4 血清型均呈现上升趋势 (数据未发表), 北京市也发生了多起 O4:KUT 和 O10:K4 导致的暴发事件^[8,21], 其他地区也有与上述情况类似的报道^[22], O4:KUT 血清型的流行变化应在腹泻散发、暴发监测中引起关注, 其污染源相关溯源工作应加强。

本次事件发生地点为带有海鲜食材的自助餐厅, 12 件可疑污染食品中副溶血性弧菌检出率为 66.67%, 霍乱弧菌检出率为 25.00%, 环境涂抹副溶血性弧菌检出率为 12.50%, 可见该餐厅存在弧菌较大范围的污染, 这可能与自助餐厅中人员交叉密集、自助加工过程复杂多样、食品烹饪生熟程度不

图2 副溶血性弧菌基于 *cg*SNP 聚类树、毒力基因分布和耐药基因分布Figure 2 Cladogram constructed on core genome SNPs and distribution of virulence and antibiotic resistance genes in isolated *V. parahaemolyticus*图3 霍乱弧菌基于 *cg*SNP 聚类树、毒力基因分布和耐药基因分布Figure 3 Cladogram constructed on core genome SNPs and distribution of virulence and antibiotic resistance genes of *V. cholerae*

易控制、导致弧菌交叉污染以及暴露于食客概率增加有关。本次暴发事件中,从不同食品中分离的副溶血性弧菌呈现遗传多样性,均为 *toxR_v*+/*tdh*-/*trh*-,且与病例分离株均不是相同克隆,F4(凉拌鱼皮)增菌液为 *toxR*+/*tdh*+但分离株却为 *toxR*+/*tdh*-,观察 F4 增菌液 *toxR_v* 基因(所有副溶血性弧菌均携带的基因)和 *tdh* 基因(致病性副溶血性弧菌携带基因) *Ct* 值分别为 29.01 和 37.73,可见 F4 食品增菌液中 2 个基因载量存在较大差异,说明在此增菌液中 *tdh*+副溶血性弧菌载量应远低于 *tdh*-副溶血性弧菌,因此分离培养中不易挑取到 *tdh*+单菌落,此种现象(导致副溶血性弧菌食物中毒的食品中 *tdh*-菌载量高于 *tdh*+菌,且增菌培养会导致 *tdh*-菌和 *tdh*+菌构成差异进一步放大)在既往副溶血性弧菌导致暴发事件多次报道^[17,19,23]。在本次事件中,虽然可疑污染食品中普遍检出了副溶血性弧菌,但仅 F4 增菌液中可检出 *tdh* 基因,说明其具有更高的致病

风险。副溶血性弧菌感染通常具有多样化,同一样品常检出多克隆副溶血性弧菌,尤其是环境和食品样品,常存在多种克隆和血清型的副溶血性弧菌菌株^[24-25]。随着高通量测序技术的发展,基因组测序成本快速降低,能够有效反映基因组变异情况,灵敏度和特异度均高于传统分子分型方法^[26],有效节约劳动成本,能够准确溯源,对食物中毒事件定性。

本地区腹泻监测中已发现非 O1/O139 霍乱弧菌呈现低强度流行特征,检出率为 0.54%^[14],广州地区非 O1/O139 霍乱弧菌的流行率约为 2%^[12],国内也有关于非 O1/O139 霍乱弧菌导致暴发事件的相关报道^[27-28],且分离株多为 *ctx*-/*t3ss*+菌株^[14,29]。本事件从 2 名病例和 3 件食品中分离到非 O1/O139 霍乱弧菌,且 P3 分离株为 *t3ss*+菌株,说明非 O1/O139 霍乱弧菌在本次暴发中可能也发挥了一定作用。分离自同一病例或食品样品的霍乱弧菌在同一遗传进化分支,携带毒力基因、耐药基因也

完全一致;但分离自不同病例或食品样品霍乱弧菌均处在不同的进化分支,携带毒力基因、耐药基因均存在一定差异,呈现遗传特征多样性。霍乱属于甲类传染病,需要对分离株进行深度准确的测定,以免影响疫情规模的评估,因此,基于基因组测序对分离株进行深度识别十分必要。

目前霍乱弧菌检测多依据 WS 289—2008 和霍乱防治手册(第六版),其依靠 O1 和 O139 血清对庆大平板上的可疑菌落进行识别,此方法会导致非 O1/O139 霍乱弧菌漏检^[8,30]。国内食源性疾病暴发事件中副溶血性弧菌具有极高的检出率^[31-34],因此在与海鲜相关食源性疾病暴发中通常忽略同样可疑造成腹泻的非 O1/O139 霍乱弧菌以及其他致病性弧菌,弧菌病原检测均采用 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌然后接种弧菌显色平板的方式,继而忽略非嗜盐性弧菌最佳的增菌液(碱性蛋白胨水)。本次事件同步采用 2 种增菌液进行增菌并进行荧光 PCR 检测,从 Ct 值分布可以发现 3% 碱性的蛋白胨水对霍乱弧菌效果不佳。将两种增菌液同步接种弧菌显色平板的生长状况也可发现基于 3% 氯化钠碱性蛋白胨水增菌仅能让副溶血性弧菌生长良好,而基于碱性蛋白胨水增菌仅能是霍乱弧菌生长良好,使用 1 种弧菌增菌液不易兼顾上述 2 种弧菌的共同生长。因此在弧菌相关食源性疾病暴发中,同步开展多种弧菌荧光 PCR 筛查,并使用多种弧菌增菌路线十分必要。非 O1/O139 霍乱弧菌导致腹泻以及食源性疾病暴发事件应在国内引起关注。

综上,本次暴发事件可认为由副溶血性弧菌和非 O1/O139 霍乱弧菌共感染导致;弧菌共感染暴发事件中应加强多病原荧光 PCR 的辅助检测,同时也需要优化弧菌培养方案。

参考文献

- [1] 黄芳,邓瑛,曲梅,等. 2010年北京市感染性腹泻病原学监测分析[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(9): 820-824.
HUANG F, DENG Y, QU M, et al. Etiological surveillance and analysis of infectious diarrhea in Beijing in year 2010[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2011, 45(9): 820-824.
- [2] 曲梅,张新,刘桂荣,等. 北京市副溶血性弧菌病原学和分子流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(12): 1255-1258.
QU M, ZHANG X, LIU G R, et al. Analysis on the etiological and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Beijing[J]. Chinese journal of Epidemiology, 2011, 32(12): 1255-1258.
- [3] 李雪原,史一,王尚敏,等. 2010—2020年中国大陆生熟交叉污染导致食源性疾病暴发事件流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(5): 1016-1021.
LI X Y, SHI Y, WANG S M, et al. Analysis on epidemic characteristics of foodborne diseases outbreaks with cross-contamination between raw and cooked food in China's Mainland from 2010 to 2020[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(5): 1016-1021.
- [4] 吴阳博,马晓晨,王超,等. 2017—2019年北京市食源性疾病暴发事件流行病学特征分析[J]. 中国预防医学杂志, 2021, 22(5): 336-340.
WU Y B, MA X C, WANG C, et al. Epidemiological characteristics of food-borne disease outbreaks in Beijing from 2017 to 2019[J]. Chinese Preventive Medicine, 2021, 22(5): 336-340.
- [5] LIAO Y X, LI Y H, WU S Y, et al. Risk factors for *Vibrio parahaemolyticus* infection in a southern coastal region of China [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(11): 881-886.
- [6] HAN D S, YU F, TANG H, et al. Spreading of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 and its serovariants: A re-analysis of strains isolated from multiple studies [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 188.
- [7] 陈美玲. 2002—2017年中国副溶血性弧菌耐药特征及分子分型特征分析[J]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2018.
CHEN M L. Analysis of drug resistance and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* in China from 2002 to 2017 [J]. Beijing: China Center for Disease Control and Prevention, 2018.
- [8] 张巍巍,李颖,王群,等. 全基因组数据应用于多克隆副溶血性弧菌感染暴发的病原学分析[J]. 疾病监测, 2020, 35(6): 518-522.
ZHANG W W, LI Y, WANG Q, et al. Application of whole genome sequencing in etiology investigation of an outbreak of polyclonal *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. Disease Surveillance, 2020, 35(6): 518-522.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 霍乱诊断标准: WS 289—2008[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Diagnostic criteria for cholera: WS 289—2008 [S]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.
- [10] 李凤娟,阚飒,王多春. 非 O1/O139 群霍乱弧菌: 流行、致病因子和耐药[J]. 疾病监测, 2014, 29(3): 239-242.
LI F J, KAN B, WANG D C. *Vibrio cholerae* non-O1/O139: Epidemic, virulence factors and drug resistance [J]. Disease Surveillance, 2014, 29(3): 239-242.
- [11] LUO Y, YE J L, JIN D Z, et al. Molecular analysis of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients in China [J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 52.
- [12] 许少洪,李映霞,李少彤,等. 广州海珠地区非 O1/非 O139 群霍乱弧菌流行状况调查及生物学特征研究[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(12): 1087-1090.
XU S H, LI Y X, LI S T, et al. Epidemic condition and biological characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* in Haizhu District of Guangzhou [J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2010, 44(12): 1087-1090.
- [13] MARIN M A, THOMPSON C C, FREITAS F S, et al. Cholera outbreaks in Nigeria are associated with multidrug resistant atypical El Tor and non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* [J]. PLoS

- Neglected Tropical Diseases, 2013, 7(2): e2049.
- [14] ARTEAGA M, VELASCO J, RODRIGUEZ S, et al. Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile, 2018 [J]. *Microbial Genomics*, 2020, 6(3): e000340.
- [15] 何牧, 张爽, 张彦春, 等. 2015—2017年北京市顺义区食源性疾病监测腹泻病病例霍乱弧菌感染及病原学特征分析[J]. *疾病监测*, 2019, 34(6): 525-528.
- HE M, ZHANG S, ZHANG Y C, et al. Infection and etiological characteristics of *Vibrio cholerae* in diarrhea patients in Shunyi district of Beijing, 2015—2017[J]. *Disease Surveillance*, 2019, 34(6): 525-528.
- [16] LI Y H, XIE X, SHI X L, et al. *Vibrio parahaemolyticus*, southern coastal region of China, 2007—2012 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(4): 685-688.
- [17] VELAZQUEZ-ROMAN J, LEÓN-SICAÍROS N, DE JESUS HERNÁNDEZ-DÍAZ L, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 on the American continent[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 3: 110.
- [18] 李颖, 张晴, 张爽, 等. 北京市顺义区三起关联性副溶血性弧菌食源性疾病暴发事件的识别与分析[J]. *疾病监测*, 2019, 34(4): 371-376.
- LI Y, ZHANG Q, ZHANG S, et al. Identification and analysis of three correlated foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Shunyi, Beijing [J]. *Disease Surveillance*, 2019, 34(4): 371-376.
- [19] 张爽, 李颖, 张彦春, 等. 2015—2017年北京市顺义区腹泻病病例副溶血性弧菌流行特征与分子分型特征分析[J]. *疾病监测*, 2018, 33(5): 381-386.
- ZHANG S, LI Y, ZHANG Y C, et al. Epidemiological and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Shunyi district of Beijing, 2015—2017 [J]. *Disease Surveillance*, 2018, 33(5): 381-386.
- [20] 马红梅, 张晴, 张爽, 等. 一起副溶血性弧菌食源性疾病暴发事件病原学检测结果分析[J]. *首都公共卫生*, 2019, 13(6): 304-307.
- MA H M, ZHANG Q, ZHANG S, et al. Etiology analysis of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Capital Journal of Public Health*, 2019, 13(6): 304-307.
- [21] HUANG Y, LYU B, ZHANG X, et al. *Vibrio parahaemolyticus* O10: K4: An emergent serotype with pandemic virulence traits as predominant clone detected by whole-genome sequence analysis—Beijing municipality, China, 2021 [J]. *China CDC Weekly*, 2022, 4(22): 471-477.
- [22] CHEN X, ZHU Q Y, LIU Y C, et al. Pathogenic characteristics of and variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from acute diarrhoeal patients in southeastern China from 2013 to 2017 [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13: 1307-1318.
- [23] LI Y, ZHANG S, LI J, et al. Application of digital PCR and next generation sequencing in the etiology investigation of a foodborne disease outbreak caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Microbiology*, 2019, 84: 103233.
- [24] 袁梦, 李博, 程妍, 等. 一起副溶血性弧菌引起食物中毒实验室溯源检测[J]. *疾病监测*, 2012, 27(3): 214-217.
- YUAN M, LI B, CHENG Y, et al. Laboratory detection of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Disease Surveillance*, 2012, 27(3): 214-217.
- [25] 杨元斌, 高红, 章丹阳, 等. 一起食源性疾病暴发中的副溶血性弧菌病原学分析[J]. *疾病监测*, 2017, 32(6): 481-485.
- YANG Y B, GAO H, ZHANG D Y, et al. Etiology of a *Vibrio parahaemolyticus* caused foodborne-disease outbreak [J]. *Disease Surveillance*, 2017, 32(6): 481-485.
- [26] HILT E E, FERRIERI P. Next generation and other sequencing technologies in diagnostic microbiology and infectious diseases [J]. *Genes*, 2022, 13(9): 1566.
- [27] 张国峰, 杨艳娜, 崔燕, 等. 一起非 O1 非 O139 群霍乱弧菌引起的食源性急性胃肠炎暴发疫情调查 [J]. *江苏预防医学*, 2022, 33(2): 200-201.
- ZHANG G F, YANG Y N, CUI Y, et al. Investigation on an outbreak of food-borne acute gastroenteritis caused by non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* [J]. *Jiangsu Journal of Preventive Medicine*, 2022, 33(2): 200-201.
- [28] 徐秋琼, 李柏生, 余泳红, 等. 广州市一起非 O1/O139 群霍乱弧菌食物中毒分离株的病原特征分析 [J]. *疾病监测*, 2017, 32(2): 149-152.
- XU Q Q, LI B S, YU Y H, et al. Etiological characteristics of *Vibrio cholerae* non-O1/O139 strains isolated from a food poisoning in Guangdong [J]. *Disease Surveillance*, 2017, 32(2): 149-152.
- [29] 肖媛, 李柏生, 效拟, 等. 广东省 2011—2013 年腹泻病病例非 O1/O139 群霍乱弧菌耐药性及分子特征 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(1): 32-35.
- XIAO Y, LI B S, XIAO N, et al. Drug resistance and molecular characteristics of non-O1/O139 *Vibrio cholerae* isolated from diarrhea cases in Guangdong province between 2011 and 2013 [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2015, 31(1): 32-35.
- [30] 肖东楼. 霍乱防治手册 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- XIAO D L. Prevention and control manual for cholera [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008.
- [31] 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.
- [32] 付萍, 刘志涛, 梁骏华, 等. 2014 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*, 2018, 30(6): 628-634.
- FU P, LIU Z T, LIANG J H, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China's mainland in 2014 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2018, 30(6): 628-634.
- [33] 李薇薇, 朱江辉, 兰真, 等. 2012 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(3): 288-293.
- LI W W, ZHU J H, LAN Z, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China mainland in 2012 [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2018, 30(3): 288-293.
- [34] 李薇薇, 朱江辉, 甄世祺, 等. 2011 年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(3):

283-288.

LI W W, ZHU J H, ZHEN S Q, et al. Analysis of foodborne dis-

ease outbreaks in China mainland in 2011[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(3): 283-288.

[上接第92页]

2.7 用于表示科学计量和具有统计意义的数字要使用阿拉伯数字。

2.8 研究对象为人时,须注明试验组、对照组受试者的来源、选择标准及一般情况等。研究对象为试验动物时需注明动物的名称、种系、等级、数量、来源、性别、年龄、体重、饲养条件和健康状况等。动物试验和人体试验均需伦理审查文件。

2.9 药品、试剂使用化学名,并注明主要试剂的剂量、单位、纯度、批号、生产单位和日期。

2.10 主要仪器、设备应注明名称、型号、生产单位、精密度或误差范围。

2.11 图、文字和表格的内容不要重复,图、表应有自明性,即不看正文就能理解图意、表意。

2.12 所引的参考文献仅限于作者亲自阅读过的。未公开发表或在非正式出版物上发表的著作如确有必要引用,可用圆括号插入正文或在当页地脚加注说明。原文作者若不超过3人应将作者姓名依次列出,中间用“,”隔开,3位以上作者则列出前3位,逗号后加“等”。参考文献格式如下:

期刊文章:[序号] 主要责任者(外文人名首字母缩写,缩写名后不加缩写点). 文献题名[文献类型标志]. 刊名, 年,卷(期): 起页-止页.

举例 [1] 汪国华,马进,季适东,等. 急性出血坏死性胰腺炎的手术治疗[J]. 中级医刊,1995,30(8):22-25.

[2] BERRY R J, LI Z, ERICKSON J D, et al. Preventing neural tube defects with folic acid in China[J]. N Engl J Med, 1999, 314: 1485-1490.

著作或编著:[序号] 主要责任者. 文献题名[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项(版次为第一版的不用标明). 出版地:出版者,出版年:起页-止页.

举例 图书:[3] 吴阶平,裘法祖,黄家驷. 外科学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 1979: 82-93.

译著:[4] ZIEGLER E E, FILER L J. 现代营养学[M]. 闻之梅,陈君石,译. 7版. 北京:人民卫生出版社, 1998: 126-129.

著作中的析出文献:[序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志]//原文献主要责任者. 原文献题名. 版本项. 出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页.

举例 [5] 白书农. 植物开花研究[M] // 李承森. 植物科学进展. 北京:高等教育出版社, 1998: 146-163.

会议文献中的析出文献:[序号]析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志/文献载体标志]//会议文献主要责任者. 会议文献题名:其他题名信息. 出版地:出版者,出版年:析出文献起页-止页[引用日期]获取和访问路径.

举例 [6] 董家祥,关仲英,王兆奎,等. 重症肝炎的综合基础治疗[C]//张定凤. 第三届全国病毒性肝炎专题学术会议论文汇编,南宁,1984. 北京:人民卫生出版社, 1985: 203-212.

科技报告:著录格式同著作或编著.

举例 [7] World Health Organization. Factors regulating the immune response: report of WHO Scientific Group [R]. Geneva:WHO, 1970:1-74.

法令、条例:[序号]主要责任者. 题名[文献类型标志]. 公布日期.

举例 [8] 中华人民共和国全国人民代表大会. 中华人民共和国著作权法[A]. 2012-03-31.

标准:[序号]主要责任者. 标准名称:标准编号[文献类型标志]. 出版地:出版者,出版年.

举例 [9] 全国文献工作标准化技术委员会第七分委员会. 科学技术期刊编排格式:GB/T 3179—1992[S]. 北京:中国标准出版社,1992.

电子文献:[序号]主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地:出版者,出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问路径.举例 [10] 肖钰. 出版业信息迈入快道 [EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.**专利文献:**[序号]专利申请者. 题名:专利国别,专利号[P]. 公告或公开日期.

3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库,本刊所付稿酬已包含这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改,若涉及内容修改会与作者商榷。编辑部收到稿件后,于3个月内通知处理意见。投稿6个月后如未收到修稿或录用通知,作者可自行处理稿件,所收稿件纸质版概不退还。来稿一经采用,即收取版面费,按规定向作者支付稿酬,并赠送杂志。

4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>,并同时邮寄单位介绍信和稿件纸版1份(需第一作者、通信作者和副高以上作者签名)。来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和E-mail地址。编辑部地址:北京市朝阳区广渠路37号院2号楼802室《中国食品卫生杂志》编辑部 邮政编码:100021 电话:010-52165596 E-mail:spws462@163.com