

## 论著

## 广州地区海产品中创伤弧菌病原学特征分型

张晶,张欣强,周勇,陶霞,吴新伟

(广州市疾病预防控制中心,广东 广州 510440)

**摘要:**目的 研究广州地区海产品中分离的创伤弧菌的毒力相关基因与脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型状况,初步建立区域PFGE溯源数据库,为该菌的分子流行病学研究和食源性疾病溯源提供支持。方法 对68株创伤弧菌进行毒力相关基因鉴定和PFGE分型,采用BioNumerics软件分析聚类关系。结果 海产品中分离的创伤弧菌均为溶血素A基因(*vhA*)核酸阳性,*vcgC/E*和16S rRNA A/B分型结果显示,共有5种基因型别,分别有CB型、EA型、CAB型、CA型和EB型。共检测出42株为BT1型。PFGE分型结果显示68株创伤弧菌有52种PFGE型别。结论 广州地区海产品中分离的创伤弧菌PFGE型别多,且相互之间关系分散;毒力相关基因型以CB型为主。

**关键词:**创伤弧菌;毒力相关基因;脉冲场凝胶电泳;分型;广州;食源性致病菌;海产品

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)04-0422-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.04.003

### Pathogenic biological characteristics of *Vibrio vulnificus* isolates from seafood in Guangzhou

ZHANG Jing, ZHANG Xin-qiang, ZHOU Yong, TAO Xia, WU Xin-wei

(Guangzhou Center for Diseases Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China)

**Abstract: Objective** To analyze the virulence related-genes and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) characteristics of *Vibrio vulnificus* isolates in Guangzhou, and to establish regional PFGE database which would support molecular epidemiology of *Vibrio vulnificus* and traceability of foodborne disease. **Methods** 68 *Vibrio vulnificus* strains were characterized by the virulence related-genes and PFGE typing. Finger printing of each strain was analyzed by BioNumerics. **Results** All *Vibrio vulnificus* strains were positive for hemolysis A gene (*vhA*). Five genotypes were detected, they were CB, EA, CAB, CA and EB type. 42 BT1 nucleic acid positive strain were detected. The 68 strains of *Vibrio vulnificus* were divided into 52 PFGE patterns. **Conclusion** The PFGE pattern of *Vibrio vulnificus* isolated from seafood was diversified, and CB type was the predominant virulence related-gene. It is necessary to strengthen the detection of *Vibrio vulnificus* in marine products to prevent the outbreak of *Vibrio vulnificus* infection.

**Key words:** *Vibrio vulnificus*; virulence related-genes; pulsed-field gel electrophoresis; typing; Guangzhou; foodborne pathogens; seafood

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)是嗜盐嗜碱型非霍乱海洋致病菌,普遍存在于亚热带海洋环境及海产品中<sup>[1]</sup>。对于有潜在慢性疾病或免疫力低下者主要通过伤口接触海水造成感染,也可经口感染,是最为常见、传播风险极高的海洋环境致病微生物,患者大多因多器官功能障碍而死亡,死亡率<sup>[2]</sup>。近年来发现创伤弧菌还可引起输卵管-卵巢脓肿<sup>[3]</sup>、呼吸道阻塞<sup>[4]</sup>等严重并发症。国内自

1991年由姜红首先报道创伤弧菌败血症死亡病例,全国已有多起相关报告<sup>[5]</sup>。创伤弧菌的致病性与其产生的多种致病因子息息相关,现在人们还不能准确及时有效地预见弧菌病爆发的时间和株型。目前广州地区海产品中创伤弧菌相关研究鲜见报道,因此,为了解广州地区创伤弧菌的分离株的病原学特征及其相关性,本研究拟对2014年食品监测中从海产品分离的68株创伤弧菌进行毒力基因检测,并结合脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术进行分子特征研究。

收稿日期:2015-12-07

基金项目:广州市医学重点学科建设项目(2013-2015-07);广州市医药卫生科技项目(20141A011054)

作者简介:张晶 女 主管技师 研究方向为病原微生物学

E-mail:zhangjing9468@sina.cn

通信作者:张欣强 男 副主任技师 研究方向为病原微生物学检验

E-mail:1768226519@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

2014年食品监测海产品中分离菌株68株,经

过 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定/药敏分析系统鉴定均为创伤弧菌,PFGE 标准株 H9812。

### 1.1.2 主要仪器与试剂

Class II BSC 生物安全柜(新加坡 ESCO),PTC-200 PCR 仪、GelDoc XR 凝胶成像系统、CHEF DR-III 脉冲场电泳仪、Quantity One(4.4.0)凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad。Hot start green master mix PCR 反应试剂盒(美国 Promega),100 bp DNA Marker Ladder(Dye plus)(日本 Takara),细菌鉴定所用试剂 API20E 和 VITEK GN 鉴定卡均购自法国梅里埃,SeaKem Gold 胶(美国 Cambraex Bio Science Rockland),蛋白酶 K(德国 Merck),限制性内切酶 *Not I*、*Xba I* 均购自美国 NEB。

表 1 创伤弧菌 PCR 检测的引物序列  
Table 1 Primers for the PCR of *Vibrio vulnificus*

目的基因	上游引物	下游引物	片段大小/bp
<i>vwhA</i>	5'-CCG CGG TAC AGG TTG GCG CA-3'	5'-CGC CAC CCA CTT TCG GGC C-3'	519
<i>vcgC</i>	5'-AGC TGC CGA TAG CGA TCT-3'	5'-TGA GCT AAC GCG AGT AGT GAG-3V	97
<i>vcgE</i>	5'-CTC AGA AAG GCT GAA TTG AC-3'	5V-GAT TAA CGC TGT AAG GCC G-3'	199
16S rRNA A	5'-CAT GAT AGC TTC GGC TCA A-3'	5'-CAC TAC CAC CTT CCT CAC GAC-3'	285
16S rRNA B	5'-GCC TAC GGG CCA AAG AGG-3'	5V-CCT GCG TCT CCG CTG GCT-3'	839
<i>SerE</i>	5V-TGT TGT TCT TGC CCA CTC TC-3'	5'-CGC GCT TAG ATT TGT CTC ACC-3'	665
BT2	5'-AGA GAT GGA AGA AAC AGG CG-3'	5'-GGA CAG ATA TAA GGG CAA ATG G-3'	344

*vwhA* 基因 PCR 反应体系:PCR *TaqMix* 25  $\mu$ l,引物各 1  $\mu$ l(终浓度 1  $\mu$ mol/L),DNA 模板 2  $\mu$ l,最后加无菌去离子水补足至 50  $\mu$ l。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,62  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,25 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖电泳检测,凝胶成像系统成像并拍照。

毒力相关基因 *vcg*、16S rRNA 和生物 II 型及血清 E 型反应体系采用 25  $\mu$ l 的反应体系:PCR *TaqMix* 25  $\mu$ l,引物各 1  $\mu$ l(终浓度 1  $\mu$ mol/L),模板 DNA 2  $\mu$ l。反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,55  $^{\circ}$ C (*vcg*)、58  $^{\circ}$ C (16S rRNA)、64  $^{\circ}$ C (生物 II 型和血清 E 型)退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个 (*vcg*、16SrRNA)、35 个 (生物 II 型和血清 E 型)循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。电泳按上述方法(引物见表 1)。

### 1.2.2 PFGE 分析

在营养琼脂平板划线,37  $^{\circ}$ C 培养 18 h,用棉签从培养皿上刮取适量细菌,均匀悬浊于约 2 ml 的 CSB 中,使透光率为 18%。取 400  $\mu$ l 菌悬液、400  $\mu$ l 1% SeaKem Gold 琼脂糖(55  $^{\circ}$ C 水浴)、20  $\mu$ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)于 1.5 ml 离心管中,用枪头轻轻混匀,立即将混合物加入模具,在室温下凝固 15 min。向 50 ml 的螺口盖管加入 5 ml 裂解液(蛋白酶 K/CLB 混合液),并将胶块移入螺口管内,将管子放在 54  $^{\circ}$ C 水浴摇床孵育 1 h,转速约 170 r/min。将裂解液倒干净,用 50  $^{\circ}$ C 15 ml 纯水洗涤胶块 2 次,每次

## 1.2 方法

### 1.2.1 核酸检测与基因分型

#### 1.2.1.1 DNA 模板制备

取 1.5 ml 菌液,4 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 50  $\mu$ l 无菌水重悬,100  $^{\circ}$ C 水浴裂解 10 min,冰上保存 10 min,8 000 r/min 离心 10 min,取上清备用。创伤弧菌标准菌株(ATCC 27562)作为阳性对照。

#### 1.2.1.2 引物设计及 PCR 扩增

根据虞艳等<sup>[6]</sup>的报道,针对创伤弧菌溶血素 *vwhA* 基因,毒力相关基因 *vcg* (*vcgC* 和 *vcgE*)、16S rRNA(16S rRNA A 和 16S rRNA B)和生物 II 型(BT2)及血清 E 型(*SerE*)合成引物,见表 1。

放在 50  $^{\circ}$ C 水浴摇床 10 min;同样用 50  $^{\circ}$ C TE 液洗涤胶块 4 次,倒掉 TE 液,加入 15 ml TE 液于 4  $^{\circ}$ C 保存胶块备用。在 1.5 ml 离心管内加入 200  $\mu$ l 酶切缓冲液,将切成 2.5 mm 宽的胶块加入离心管内,将管子放在 37  $^{\circ}$ C (*Not I*)水孵育 15 min。用枪头吸出酶切缓冲液,每管加入 200  $\mu$ l 酶切反应体系,*Not I* 在 37  $^{\circ}$ C 水浴中孵育 4 h。用枪头吸出酶切液,在每个管内加入 200  $\mu$ l 0.5  $\times$  TBE,放置 5 min。把梳子放入胶槽,并把胶块加在梳子齿上,缓慢倒入 100 ml 60  $^{\circ}$ C 0.5  $\times$  TBE 制备的 1% SeaKem Gold 琼脂糖,放置 30 min,拔出梳子。在电泳槽里加入 2 200 ml 0.5  $\times$  TBE,调好电泳参数,将胶放入电泳槽,加入硫脲 760  $\mu$ l,电泳 19 h。取出胶块放在 400 ml EB 溶液中染色 30 min,脱色 15 min,紫外灯下观察结果,并通过凝胶成像照相,分析方法采用 BioNumerics 5.0 分析软件对 DNA 指纹图谱进行聚类分析,量化不同菌株之间基因水平的亲缘关系。

## 2 结果

### 2.1 毒力相关基因分型

68 株创伤弧菌菌株溶血素 A 基因(*vwhA*)核酸均为阳性。生物分型:BT1 型(鸟氨酸脱羧酶和吡嗪阳性)42 株,BT2 型 26 株,血清 E 型未检出。

*vcgC/E* 和 16S rRNA A/B 毒力相关基因分型结果显示:*vcgC* 和 16S rRNA B 型(CB 型)34 株,*vcgE*

和 16S rRNA A 型 (EA 型) 30 株, *vcgC* 和 16S rRNA A 型 (CA 型) 2 株, *vcgC* 和 16S rRNA A/B 型 (CAB 型) 有 1 株, *vcgE* 和 16S rRNA B 型 (EB 型) 1 株 (见图 1), CB 型和 EA 型为主要基因型。各型别之间经  $\chi^2$  检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 PFGE 图谱

在 PFGE 图谱中相似系数在 0.85 以上的菌株可以判断是流行病学相关。通过软件聚类分析显示 68 株创伤弧菌有 52 种 PFGE 型别, 较为分散 (详见图 2), 图谱相似性为 44.5% ~ 97.3%。未发现有

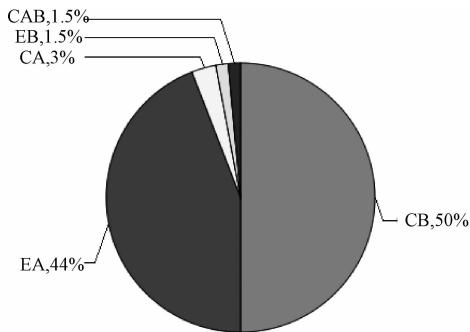


图 1 *vcgC/E* 和 16S rRNA A/B 毒力相关基因分型  
Figure 1 Genotyping of virulence related-genes *vcgC/E* and 16S rRNA A/B

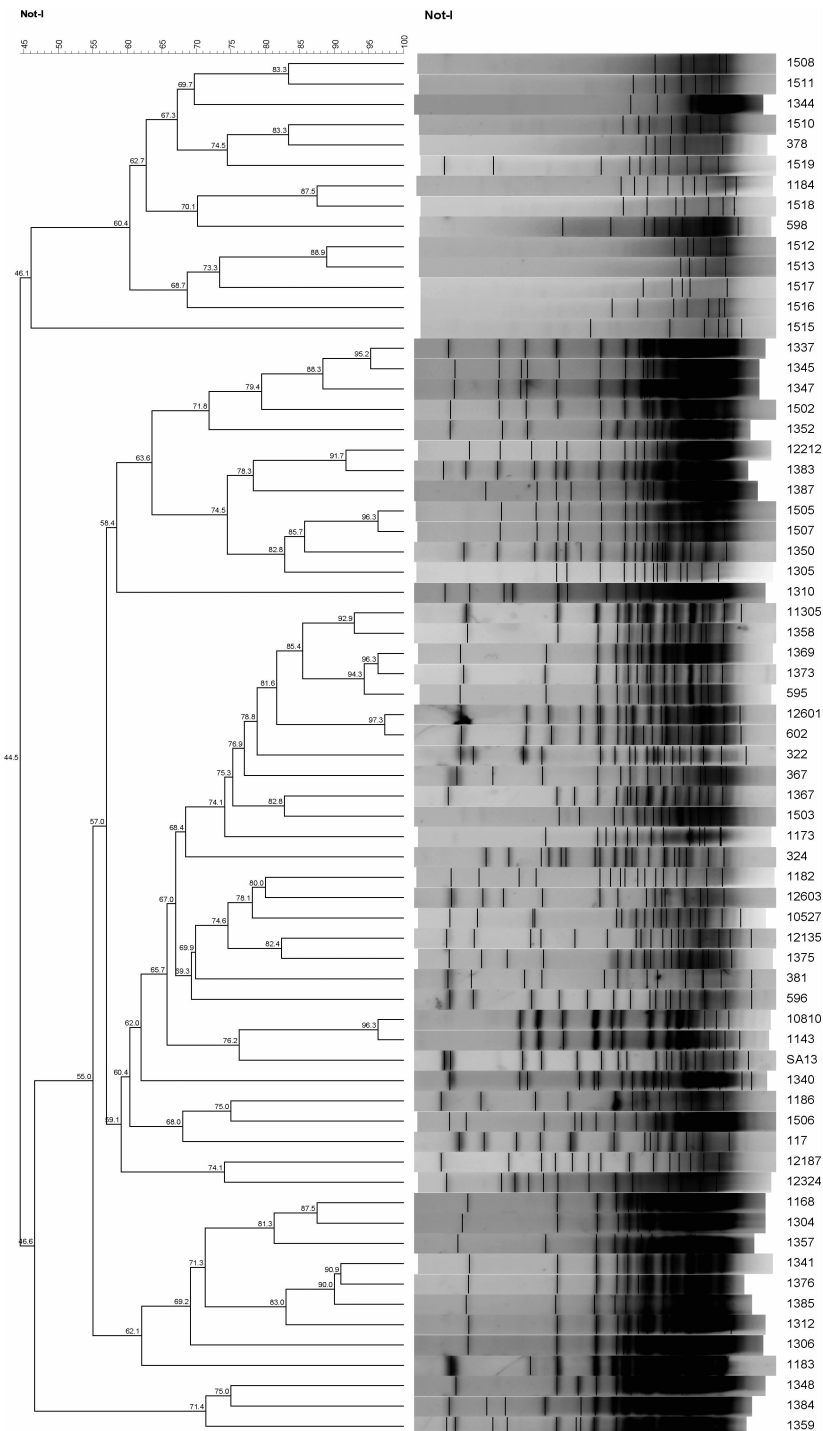


图 2 创伤弧菌的 PFGE 聚类分析图  
Figure 2 PFGE clustering analysis of *Vibrio vulnificus*

集中聚类,说明广州地区海产品中分离的创伤弧菌基因型较多。

### 3 讨论

近年来研究发现,弧菌的致病性与多种毒力因子密切相关,毒力基因是产生毒力因子的物质基础<sup>[7]</sup>。多次大面积流行的弧菌病原都来自于水体外环境,可以推测水体是一个天然的弧菌毒力基因保存库,通过海产品的进出口等多种途径很容易造成毒力基因的地域性转移及种间与株间水平转移,造成不同弧菌种间存在相同的毒力基因,相同的种内也存在不同的基因,从而可能使当地的某些无毒株转变为重要的有毒株,这可能是不断出现弧菌新病原的重要原因之一<sup>[7]</sup>。因此开展海产品中弧菌毒力基因及其多样性研究,有助于揭开弧菌环境株的致病机理,发现毒力基因对弧菌进化的真正贡献及现有毒力基因的演化来源,特别是弧菌的株型分类与鉴定,便于能够及时有效地预防弧菌传染病的大面积爆发。

创伤弧菌在海产品和水体外环境中广泛存在,其毒力基因、调控机制和致病机理比较复杂。广州地区对创伤弧菌的报道极少,其原因可能包括有饮食和烹饪习惯导致创伤弧菌感染率低、临床实验室对创伤弧菌感染的检测能力缺乏以及菌株毒力差异等因素造成。本研究以2014年食品监测海产品中分离的创伤弧菌为研究对象,了解 *vcgC/E* 和 16S rRNA *A/B* 毒力相关基因的分布情况。结果表明广州地区创伤弧菌的基因型呈多样性,分别有 CB 型、EA 型、CA 型、CAB 型和 EB 型。以 CB 型和 EA 型为主要基因型,分别占所测菌株的 50% 和 44%。虞艳等<sup>[6]</sup>对杭州地区创伤弧菌的调查显示 CB 型亦为主要基因型(66%),但 EA 型仅检出 6 株,可能与地域差异有关。调查还表明 CB 型为临床分离创伤弧菌的主要基因型<sup>[8]</sup>,同时据宿主和生化特征,创伤弧菌分生物 BT1、BT2 和 BT3。BT1 是人类致病菌,此次研究中 BT1 型 42 株,比例高达 62%,提示广州市海产品中存在创伤弧菌感染的风险高,应引起关注。

PFGE 技术是目前国际公认的一种基因分型方

法,因为其分辨力高,重复性好而被很多实验室采用,同时结合分离菌株的流行病学相关信息,可作为研究创伤弧菌感染与传播的有力工具<sup>[9-10]</sup>。本研究从广州地区海产品中分离的菌株 PFGE 分型结果显示 68 株创伤弧菌有 52 种 PFGE 型别,聚类分析显示非常分散,其从广州地区海产品中分离的相同或不同毒力相关基因型菌株之间图谱均存在明显差异,显示污染海产品分离株多为遗传不相关菌株。

本试验针对广州地区海产品中分离的创伤弧菌进行了毒力相关基因分型和 PFGE 分型,有利于研究创伤弧菌在食品链中的传播机制,也为研究创伤弧菌引起的疾病溯源及其分子流行病学提供了一定的技术基础。

### 参考文献

- [1] Mark S S, Rohinee N P. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(2): 177-188.
- [2] Gulig P A, Bourdage K L, Starks A M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *J Microbiol*, 2005, 43(1): 118-131.
- [3] Midturi J, Baker D, Winn R, et al. Tubo-ovarian abscess caused by *Vibrio vulnificus* [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2005, 51(2): 131-133.
- [4] HUANG S F, CHEN C T. *Vibrio vulnificus*-a rare but fulminant pathogen causing airway obstruction [J]. *Am J Emerg Med*, 2005, 23(2): 221-222.
- [5] Hsueh P R, LIN C Y, TANG H J, et al. *Vibrio vulnificus* in Taiwan [J]. *Emerg Infect*, 2004, 10(8): 1363-1368.
- [6] 虞艳, 潘宇航, 石亚素, 等. 多株创伤弧菌的基因分型和药敏试验 [J]. *疾病监测*, 2013, 28(2): 136-139.
- [7] 谢珍玉, 胡超群. 弧菌毒力基因水平转移与进化的研究进展 [J]. *热带海洋学报*, 2005, 24(3): 86-95.
- [8] Warner E B, Oliver J D. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(1): 80-85.
- [9] González-Escalona N, Whitney B, Jaykus A, et al. Comparison of direct genome restriction enzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Vibrio vulnificus* and their correspondence with multilocus sequence typing data [J]. *APPL Environ Microbiol*, 2007, 73(22): 7494-7500.
- [10] Tamplin M L, Jackson J K, Buchrieser C, et al. Pulsed-field gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental *Vibrio vulnificus* isolates [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(10): 3572-3580.