

- 中华流行病学杂志,2008,29(2):204.
- [10] 宋晓红,乔玫,刘晔.2010年山西省食品中食源性致病菌监测分析[J].中国食品卫生杂志,2013,25(4):374-377.
- [11] 徐景野,闫鹏,杨元斌,等.宁波地区食品中致病菌监测与流行株分析[J].中国食品卫生杂志,2015,27(5):562-568.
- [12] 盛冬萍,谢益君,陈米娜,等.宁波地区食品中致病菌污染物检测与调查[J].中国食品卫生杂志,2013,25(4):369-374.
- [13] 裴晓燕,余波,张秀丽,等.中国内陆6省(自治区)淡水鱼养殖、销售和餐饮环节常见嗜盐性弧菌污染调查[J].中国食品卫生杂志,2016,28(1):79-83.
- [14] CHEN X, CHEN Y, YANG Q, et al. *Plesiomonas shigelloides* infection in Southeast China[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e77877.
- [15] Escobar J C, Bhavnani D, Trueba G, et al. *Plesiomonas shigelloides* infection, Ecuador, 2004-2008 [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(2): 322-324.
- [16] 刘翔,刘阳波,郭邦成,等.2008—2013年宁夏小肠结肠炎耶尔森菌分布特征分析[J].中国人兽共患病学报,2015,31(3):260-263.
- [17] Yano Y, Hamano K, Tsutsui I, et al. Occurrence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp. in marine species of shrimps cultured at inland low salinity ponds[J]. Food Microbiol, 2015, 47(11): 21-27.
- [18] 朱冬梅,刘书亮,彭珍,等.肉鸡源弯曲菌的分离、多重PCR鉴定及其耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2014,30(4):390-396.
- [19] 陈洪友,屠丽红,陈敏,等.贝类水产中副溶血性弧菌菌型分布研究[J].疾病监测,2014,29(7):522-527.
- [20] 鞠长燕,黄锐敏,段永翔,等.食物中毒中不同血清型副溶血性弧菌基因特征分析[J].华南预防医学,2014,40(3):229-234.

风险监测

2012—2014年无锡市不同来源副溶血性弧菌的病原学特征分析

韩毅,沙丹

(无锡市疾病预防控制中心,江苏无锡 214023)

摘要:目的 了解近年来无锡市不同来源的副溶血性弧菌的毒力基因携带情况、血清型和耐药性。方法 对于分别来源于食源性疾病事件、哨点医院监测标本、外环境监测样品的92株副溶血性弧菌分离株,采用PCR进行毒力基因鉴定,玻片凝集试验进行血清分群,纸片法进行耐药试验。结果 92株副溶血性弧菌中,食源性疾病事件、哨点医院、外环境监测这三种来源的分离株中携带 *tdh* 基因的菌株分别占85.7% (12/14)、88.6% (39/44)和14.7% (5/34);食源性疾病事件分离株和哨点医院分离株血清群以O3为主,分别占比85.7% (12/14)和65.9% (29/44),外环境监测分离株无优势血清群;食源性疾病事件、哨点医院、外环境监测这三种来源的分离株中耐氨苄西林的菌株分别占35.7% (5/14)、65.9% (29/44)和11.8% (4/34)。不同来源的菌株对氯霉素、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、亚胺硫霉素都表现为100.0%敏感。结论 2012—2014年无锡市从食源性疾病事件、哨点医院监测标本和外环境监测样品分离出的副溶血性弧菌在毒力基因、血清群、耐药情况上均有较大差异。建议结合耐药试验结果,在无锡市临床治疗副溶血性弧菌感染病例时,抗生素使用首选氯霉素、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、亚胺硫霉素。

关键词:副溶血性弧菌;毒力基因;血清型;耐药性;食源性致病菌;无锡

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0795-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.024

Etiological analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Wuxi during 2012-2014

HAN Yi, SHA Dan

(Wuxi Center For Disease Control and Prevention, Jiangsu Wuxi 214023, China)

Abstract: Objective To investigate the virulence gene, serotype and antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Wuxi. **Methods** For 92 strains of *Vibrio parahaemolyticus*, PCR was used to detect virulence gene. Serotype was determined by serum agglutination test. Antibiotic resistance was performed by disc diffusion method. **Results** The detection rate of *tdh* gene among food poisoning strains was 85.7% (12/14). The detection rate of *tdh* among sentinel hospital strains was 88.6% (39/44). But the detection rate of *tdh* among environment strains was only

14.7% (5/34). Serotype O3 was found to be the dominant serotype among the strains from food poisoning (85.7%, 12/14) and sentinel hospital (65.9%, 29/44), while there was no dominant serotype found in environment strains. The rate of ampicillin resistance among food poisoning strains was 35.7% (5/14). The rate of ampicillin resistance among sentinel hospital strains was 65.9% (29/44) and was 11.8% (4/34) among environment strains. All strains were 100.0% sensitive to ampicillin/sulbactam, gentamycin, iminodiaetic, thienamycin. **Conclusion** The virulence gene, serotype and antibiotic resistance of *V. parahaemolyticus* isolated from different sources were different. Ideal antibiotic for treatment of *V. parahaemolyticus* were ampicillin/sulbactam, gentamycin, iminodiaetic and thienamycin.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; virulence gene; serotype; antibiotic resistance; foodborne pathogenic bacteria; Wuxi

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)广泛分布于沿岸海水、海河交界环境中,在鱼类和贝类等海水产品中检出率较高。由该菌引起的食源性疾病呈世界性分布,尤其在沿海地区发病率较高。国家食源性疾病预防网及国家食品安全信息监测系统统计数据显示:2002—2007年暴发的细菌性食源性疾病事件中,副溶血性弧菌位居病原菌之首^[1]。江苏省无锡市是副溶血性弧菌感染的高发地区,系统的研究该地区环境和食品中副溶血性弧菌的带菌水平以及流行菌株的生物学特征,对于了解副溶血性弧菌的传播规律、新型致病菌株特征以及制定有效的控制策略具有重要意义。本研究收集了2012—2014年无锡市不同来源的副溶血性弧菌菌株共92株,对这些菌株进行耐热直接溶血素(*tdh*)、耐热相关溶血素(*trh*)、不耐热溶血素(*tlh*)三种毒力基因的检测^[2-4]、血清学检测和耐药试验。综合检测结果对副溶血性弧菌在无锡市的流行情况进行分析,为今后研究及疫情暴发突发事件处理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株来源

所有菌株均来自2012—2014年无锡市检出的副溶血性弧菌,由无锡市疾病预防控制中心菌种库保存。其中14株为食源性疾病预防事件中病人的粪便、肛拭、食品及环境分离株,44株为652例哨点医院腹泻病人的粪便、肛拭分离株,34株为641份外环境监测样品(包括海产鱼类、虾类、贝类、淡水产品、太湖水等)分离株,根据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》^[5]进行检验。所有菌株均使用全自动细菌鉴定仪经过系统性生化鉴定,确定为副溶血性弧菌且符合率都在90%以上。

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动细菌鉴定仪(法国Bio Merieux),PCR仪(德国SensoQuest Labcycle),GelDoc XR凝胶成像系统(美国Bio-Rad)。

11种副溶血性弧菌诊断血清(日本生研株式会社),药敏纸片(北京陆桥生物技术有限公司),TCBS琼脂、营养琼脂均购自杭州微生物试剂有限公司,副溶血性弧菌显色培养基(法国科玛嘉)。

1.2 方 法

1.2.1 引物合成

FDA 2004标准推荐使用的三对毒力基因引物见表1,由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表1 副溶血性弧菌毒力基因检测的引物序列

Table 1 Primer sequences of *Vibrio parahaemolyticus* virulence gene detection

基因名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>tdh</i>	GTAAAGGTCCTGACTTTTGGAC	270
	TGGAATAGAACCTTCATCTCACC	
<i>tlh</i>	AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450
	GCTACTTCTAGCATTTTCTCTGC	
<i>trh</i>	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	500
	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	

1.2.2 毒力基因检测

模板制备:经系统生化鉴定为阳性的VP菌株转血平板,36℃培养24h,刮取菌落于100 μl ddH₂O中,100℃水浴15min,以10 509 × g离心10min,吸取上清,置于-20℃备用

PCR反应体系(20 μl):2 × mixture 10 μl,上、下游引物各0.5 μl,水8 μl,模板1 μl。

PCR反应条件:3种毒力基因的PCR条件相同,均为94℃预变性3min;94℃变性1min,60℃退火1min,72℃延伸1min,共30个循环;72℃延伸7min。取5 μl扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳(180 V,30 min),凝胶成像仪读取图像。

1.2.3 血清学分型

根据GB 4789.7—2013^[5]进行O抗原检测。

1.2.4 耐药试验

根据美国临床标准委员会(NCCLS)推荐的K-B法进行,使用甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑、环丙沙星、氨苄西林等10种抗生素,耐药结果按照《美国

临床实验室标准化委员会标准与指南》^[6] 标准判定。

2 结果

2.1 毒力基因检测结果

食源性疾病事件、哨点医院、外环境监测 3 种来源菌株的毒力基因携带情况详见表 2。在 2012—2014 年无锡市收集到的 92 株 VP 菌株中,携带 *tdh* 基因的菌株 56 株,携带率 60.9%,携带 *trh* 基因的菌株 7 株,携带率 7.6%,携带 *tlh* 基因的菌株 92 株,携带率 100.0%。

表 2 副溶血性弧菌毒力基因携带情况

Table 2 Virulence genes of VP

菌株来源	<i>tdh</i> 基因		<i>trh</i> 基因		<i>tlh</i> 基因	
	菌株数/株	携带率/%	菌株数/株	携带率/%	菌株数/株	携带率/%
食源性疾病事件	12	85.7(12/14)	2	14.3(2/14)	14	100.0(14/14)
哨点医院	39	88.6(39/44)	4	9.1(4/44)	44	100.0(44/44)
外环境监测	5	14.7(5/34)	1	2.9(1/34)	34	100.0(34/34)
合计	56	60.9(56/92)	7	7.6(7/92)	92	100.0(92/92)

2.2 菌株血清分型结果

在 92 株 VP 的血清学分型中,三种不同来源分离株的血清型分型结果见表 3。从表 3 可以看出,除 7 株由于所购诊断血清(11 种)限制未能分群,其余血清型分布在 O1、O2、O3、O4、O5、O8、O10、O11。其中 O3 群所占比例最大,为 52.2%(48/92),其余依次为

O4、O1、O10、O2、O5、O8、O11。14 株食源性疾病分离株中,O3 群占 85.7%(12/14),另有 1 株 O1 和 1 株 O4;44 株哨点医院分离株,O3 群占 65.9%(29/44),其次是 O4 占 11.4%(5/44),O10 占 6.8%(3/44),其余血清型占 15.9%(7/44);34 株外环境监测分离株,O3 占 20.6%(7/34),无明显优势株。

表 3 不同来源的 VP 血清型分布情况(株)

Table 3 Serotype distribution of VP

菌株来源	O 抗原								其他血清	合计
	O1	O2	O3	O4	O5	O8	O10	O11		
食源性疾病事件	1	0	12	1	0	0	0	0	0	14
哨点医院	1	2	29	5	1	1	3	0	2	44
外环境监测	6	3	7	4	3	2	3	1	5	34
合计	8	5	48	10	4	3	6	1	7	92

2.3 耐药试验结果

在 92 株 VP 的耐药试验中,氯霉素、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、亚胺硫霉素 100.0% 敏感;甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑 4 株耐药(4.3%);环丙沙星 2 株耐药(2.2%),5 株中介(5.4%);头孢西丁 3 株中介(3.3%);头孢唑啉 26 株中介(28.3%);四环素 12 株中介(13.0%);氨苄西林 38 株耐药(41.3%),36 株中介(39.1%),18 株敏感(19.6%),具体见表 4。

14 株食源性疾病分离株中,甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑 1 株耐药;环丙沙星 1 株耐药,1 株中介;氨苄西林 5 株耐药,6 株中介,3 株敏感。44 株哨点医院分离株中,甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑 3 株耐药;环丙沙星 1 株耐药,4 株中介;氨苄西林 29 株耐药,12 株中介,3 株敏感。34 株外环境监测分离株中,氨苄西林 4 株耐药,18 株中介,12 株敏感,具体见表 5。

3 讨论

尽管副溶血性弧菌是引起食源性疾病的重要

表 4 92 株 VP 耐药率、中介率和敏感率情况

Table 4 Resistance mediation and sensitive rate of VP

抗生素	耐药		中介		敏感	
	菌株数/株	耐药率/%	菌株数/株	耐药率/%	菌株数/株	耐药率/%
甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑	4	4.3	0	0.0	88	95.7
环丙沙星	2	2.2	5	5.4	85	92.4
氯霉素	0	0.0	0	0.0	92	100.0
氨苄西林/舒巴坦	0	0.0	0	0.0	92	100.0
氨苄西林	38	41.3	36	39.1	18	19.6
庆大霉素	0	0.0	0	0.0	92	100.0
头孢西丁	0	0.0	3	3.3	89	96.7
头孢唑啉	0	0.0	26	28.3	66	71.7
四环素	0	0.0	12	13.0	80	87.0
亚胺硫霉素	0	0.0	0	0.0	92	100.0

病原菌,但大多数的菌株没有致病能力,只有少数高毒力的菌株才会致病^[7],其毒力基因主要有 *tdh*、*trh*、*tlh* 等。*tdh* 可在我妻氏血平板上产生一种特殊的溶血现象,称作神奈川现象。临床上分离出的 VP 株几乎都是神奈川阳性,因此通常认为神奈川阳性为产毒菌株,阴性为非产毒菌株^[8]。尽管 *tdh* 被认为是 VP 的主要毒力因子,流行病学调查也表明

表5 不同来源的VP耐药试验情况(株)

Table 5 Antibiotic resistance of VP from different sources

抗生素	食源性疾病事件			哨点医院			外环境监测		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑	1	0	13	3	0	41	0	0	34
环丙沙星	1	1	12	1	4	39	0	0	34
氯霉素	0	0	14	0	0	44	0	0	34
氨苄西林/舒巴坦	0	0	14	0	0	44	0	0	34
氨苄西林	5	6	3	29	12	3	4	18	12
庆大霉素	0	0	14	0	0	44	0	0	34
头孢西丁	0	1	13	0	2	42	0	0	34
头孢唑啉	0	6	8	0	19	25	0	1	33
四环素	0	3	11	0	6	38	0	3	31
亚胺硫霉素	0	0	14	0	0	44	0	0	34

VP的致病力同其*tdh*有高度相关性,但由于近几年食源性疾病的临床分离菌株中也有少数呈神奈川阴性的,其携有编码*trh*基因,可导致肠胃炎的发生,证明了*trh*也是一些菌株,特别是神奈川阴性菌株的毒力因子^[9]。*tlh*是VP的一种特异性基因,所有的VP均含有该基因,因此检测该基因对VP的鉴定具有重要意义^[10-11]。但*tlh*的功能和致病性迄今仍不清楚,还需要进一步研究。

本研究对2012—2014年无锡市VP的*tdh*、*trh*、*tlh*三种毒力基因进行检测,分离的92株VP的*tdh*、*trh*、*tlh*基因携带率分别为60.9%、7.6%和100.0%,携带三种毒力基因的菌株占7.6%。不同来源的菌株其*tdh*毒力基因的携带情况有较大差异,食源性疾病事件分离株和哨点医院分离株的*tdh*携带率分别为85.7%和88.6%,外环境监测分离株*tdh*携带率(14.7%)明显少于前两种来源分离株,这与有关报道^[12]相一致。食源性疾病事件分离株*trh*携带率最高(14.3%),其次为哨点医院分离株(9.1%),外环境监测分离株最少(2.9%),三种来源的菌株*tlh*携带率均为100.0%。环境产品分离株中携带*tdh*基因的致病株较少检出,可能是由于致病株不占优势地位,其拷贝数低于现有检测方法,导致难以检出。

92株VP的O型血清群主要分布在O3、O4、O1、O10、O2、O5、O8、O11,O群分型率92.4%(85/92),O3群占优势地位(52.2%)。食源性疾病事件、哨点医院和外环境监测分离株中O3群分别占85.7%、65.9%和20.6%,同另外两种来源相比,外环境监测分离株O群分布率较为平均。外环境监测分离到的O4、O1、O3株在哨点医院和食源性疾

病事件中,可能会分离到一种以上的血清群,因此有必要挑取多个形态的菌落并进行血清凝集,避免漏检。

从耐药试验的结果可以看出,无锡市检出的VP对氨苄西林具有较高的耐药性,耐药菌株比例达到了41.3%(38/92),只有19.6%(18/92)的菌株对氨苄西林敏感。食源性疾病事件、哨点医院及外环境监测分离株的氨苄西林耐药率分别为35.7%(5/14)、65.9%(29/44)和11.8%(4/34)。外环境监测分离株的耐药率明显少于食源性疾病事件分离株和哨点医院分离株,这可能是由于人们滥用抗生素导致不同来源的VP在耐药性上的分化。Han等^[13]在国外的研究中发现VP对氨苄西林的耐药率达到了81%,虽然无锡市的氨苄西林菌株耐药率没有达到这个水平,但也应该引起足够的重视,建议不再使用该类药物。甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲噁唑和环丙沙星也有少量的耐药菌株,分别为4株和2株,这两种药也应慎用。对于中介率较高的头孢唑啉(28.3%,26/92)和四环素(13.0%,12/92),应警惕VP向耐药株转移。氯霉素、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、亚胺硫霉素这四类药对VP均为100.0%敏感,建议无锡市针对VP的用药可以选用这些类别。

参考文献

- [1] 马聪,朱海明,严纪文,等.不同来源的副溶血性弧菌定量分析及毒素基因检测[J].中国食品卫生杂志,2009,21(5):402-405.
- [2] Nishibuchi M, Taniguchi T, Misawa T, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene (*trh*) encoding the hemolysin related to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infect Immun, 1989, 57(9):2691-2697.
- [3] Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (*tdh*) and *tdh*-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis[J]. Infect Immun, 1990, 58(11):3568-3573.

- [4] 周志江,刘纯杰,黄上媛,等.用 PCR 检测副溶血性弧菌耐热溶血素基因[J].中国兽医学报,1996,16(3):252-255.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.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[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [6] NCCLS.美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准与指南(2010版)[S].2010.
- [7] 陈瑞英,鲁建章,苏意诚,等.食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J].食品科学,2007,28(1):341-346.
- [8] 杨兰萍,姚宗蓓,陈悦,等.应用 PCR 检测副溶血性弧菌的耐热溶血毒素基因 *tdh* [J].上海预防医学杂志,2004,16(3):145-146.
- [9] 张蔚,孟冬梅,潘劲草,等.杭州地区临床和环境分离副溶血性弧菌菌株携带毒力基因的特征[J].中华预防医学杂志,2004,38(3):200-203.
- [10] 李庆山.副溶血性弧菌所致食物中毒的研究进展[J].中国卫生检验杂志,2009,19(2):461-463.
- [11] Bej A K, Patterson D P, Brasher C W, et al. Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* [J]. J Microbiol Methods, 1999, 36(3):215-225.
- [12] 张勇,赖植发,周海涛,等.副溶血性弧菌临床分离株血清型、毒力基因和 PFGE 分子分型特征分析[J].卫生研究,2013,42(4):619-624.
- [13] HAN F F, Robert D, Marlene E, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21):7096-7098.

《环境与职业医学》杂志 2017 年征订通知

《环境与职业医学》杂志(<http://jeom.scdc.sh.cn>;8081)创刊于 1984 年,系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办,国内外公开发行的专业性学术期刊(ISSN 2095-9982, CN 31-1879/R, CODENHYZYAZ)。曾多次被评为华东地区优秀期刊和中华预防医学会系列杂志优秀期刊。

《环境与职业医学》目前已入选中国科学引文数据库(CSCD)源期刊、中文核心期刊(预防医学、卫生学类核心期刊)、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、RCCSE 中国核心学术期刊(A),并被美国化学文摘、乌利希国际期刊指南、英国国际农业与生物科学研究中心、英国全球健康及美国剑桥科学文摘(自然科学)等数据库收录。

本刊内容主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作,环境危害因素及其治理,以及有关职业和环境卫生学的学术研究、科研成果及实践经验,包括职业与环境流行病学、环境检测、毒理学、环境生态学和职业病临床、应急救援、卫生管理、环境污染与治理、职业病防治实践等方面的论著、实验研究、调查研究、综述、短篇报道、病例报告等。可供广大疾病控制、卫生监督、厂矿劳动安全、职业卫生与职业病防治、环境保护、环境科学研究等相关单位专业人员,医学院校教学和科研等人员参考,欢迎订阅。

本刊为月刊,大 16 开,96 页,每月 25 日出版,定价每期 20 元,全年 240 元(含包装及平邮邮资,需挂号或速递者邮资另计)。

由邮局及自办结合发行,邮发代号:4-568,邮局可办理 2017 年征订工作。汇款可通过如下两种方式,

1. 银行汇款

户名:上海市疾病预防控制中心;账号:3166 3803 0016 65382;开户行:上海银行白玉支行。

2. 邮局汇款

上海市延安西路 1326 号(生物大厦)22 楼《环境与职业医学》杂志编辑部,邮编:200052。

读者如需单行本或合订本,可直接向编辑部联系邮购。对历年本刊所出的专题专刊(含会议论文集),需要者亦可联系邮购。

联系人:葛宏妍;电话:021-61957507;传真:021-62084529;E-mail:zazhi2@scdc.sh.cn。