

食物中毒

一起多型别副溶血性弧菌引起农村喜宴食物中毒的溯源分析

高雯洁, 张晓飞, 王恒辉, 郭金磊, 高蕾, 陈黎霞
(嘉兴市疾病预防控制中心, 浙江 嘉兴 314050)

摘要:目的 通过对腹泻患者肛拭子标本和外环境样品的病原菌检测, 利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型技术对一起多型别副溶血性弧菌引起农村喜宴食物中毒原因开展溯源分析。方法 对采集的共20份肛拭子标本和外环境样品进行病原学检测, 并对检出的副溶血性弧菌进行血清分型、PFGE分型及 *tdh*、*trh*、*tlh*、*toxR* 基因检测。结果 20份样品/标本中15份检出副溶血性弧菌, 11株为 *tdh* + *trh*-*tlh* + *toxR* + 基因型, 4株为 *tdh*-*trh*-*tlh* + *toxR* + 基因型。其中12份患者肛拭子标本中有9份检出副溶血性弧菌, 7份为 O3: K6血清型, 2份为 O2群; 3份墩板涂抹样品中有2份检出 O3: K6血清型, 1份为 O1群; 3份剩余食物样品中有2份检出副溶血性弧菌, 分别为 O1群和 O10群; 厨师肛拭子标本检出 O11群副溶血性弧菌; PFGE聚类分析显示7份患者肛拭子标本和2份墩板涂抹样品中的 O3: K6型副溶血性弧菌带型高度同源, 剩余食物来源的副溶血性弧菌核酸降解未能显示 PFGE条带。结论 本次事件是可疑食物交叉污染切菜墩板引起的以 O3: K6血清型为主的多种血清型别副溶血性弧菌的食物中毒。

关键词: 副溶血性弧菌; 血清型; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳; 食源性致病菌; 溯源

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2018)03-0325-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.03.021

**Traceability analysis on a case of food poisoning caused
by multiple serotypes of *Vibrio parahaemolyticus***

GAO Wen-jie, ZHANG Xiao-fei, WANG Heng-hui, GUO Jin-lei, GAO Lei,
CHEN Li-xia

(Jiaxing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Jiaxing 314050, China)

Abstract: Objective To investigate the source of a food poisoning case in a rural wedding banquet based on the PFGE analysis of the pathogenic bacterium isolated from the patient anal swabs and polluted external environment samples.

Methods Etiological examinations of 20 specimens were performed. Serological typing, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis and *tdh*, *trh*, *tlh*, *toxR* genes test were carried out on the *Vibrio parahaemolyticus* (VP) detected.

Results Fifteen strains of VP were isolated from 20 samples. Gene tests showed that 11 specimens were *tdh*, *tlh*, *toxR* genes positive, while 4 were *tlh*, *toxR* genes positive. Nine out of 12 patient anal swab samples were VP positive, of which 7 were O3: K6 serotype, while the remaining were O2 group; All 3 chopping block daub samples were VP positive, of which 2 were O3: K6 serotype, the third one was O1 group; 2 out of 3 remaining foods were VP positive, which were O1, O10 group respectively. The anal swab sample of the chef was O11 group positive. PFGE analysis revealed that the O3: K6 of the patient anal swabs and chopping block daub samples were highly homologous. **Conclusion** This was a food poisoning outbreak caused by multiple serotypes of VP mainly by O3: K6, which might be contaminated through chopping block.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; virulence gene; pulsed-field gel electrophoresis; foodborne pathogenic bacteria; traceability

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是重要的食源性致病菌之一, 广泛存在于近海岸的海水、海底沉积物、海产品中, 也是沿海地区引起食物

中毒最常见的致病菌^[1]。近年来, 在一些沿海地区, 副溶血性弧菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒之首, 食物中毒腹泻患者肛拭子中检出的副溶血性弧菌占检出阳性菌的首位^[2]。

2012年10月, 嘉兴市某村民家中摆喜宴, 当晚有上百名赴宴者出现腹痛、腹泻等不适症状, 其中40多名陆续去医院就诊, 流行病学调查表明, 病例主要症状以腹痛、腹泻为主, 腹痛表现为脐周绞痛

收稿日期: 2017-10-30

基金项目: 嘉兴市科技计划项目(2016AY23089)

作者简介: 高雯洁 女 副主任技师 研究方向为微生物检验

E-mail: gwjof@163.com

或阵发性疼痛,腹泻以水样便为主,伴发热、恶心、呕吐等,其中一名厨师次日也有腹痛症状,腹泻数次。对从采集的病例肛拭子标本、墩板涂抹样品及剩余食物样品中分离出的副溶血性弧菌进行基因检测和脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型,对导致食物中毒的病因进行溯源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品/标本来源

采集医院就诊患者肛拭子标本12份,在喜宴家厨房采集墩板涂抹样品3份、剩余食物(凉拌海蛰、猪肚炒青椒、烤鸭)3份,厨师手涂抹样品、肛拭子标本各1份,共20份,检测项目为副溶血性弧菌、沙门菌、致泻大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌。

1.1.2 主要仪器与试剂

ATB细菌鉴定仪(法国梅里埃),7300实时荧光PCR仪(美国ABI),CHEFMAP脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR凝胶成像仪均购自美国Bio-Rad。

弧菌显色培养基、沙门菌显色培养基均购自郑州博赛生物科技公司,3%氯化钠碱性蛋白胨水、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、3%氯化钠三糖铁、缓冲蛋白胨水、四硫磺酸钠煌绿增菌液、亚硒酸盐胱氨酸增菌液、亚硫酸铋琼脂、三糖铁、营养琼脂、7.5%氯化钠肉汤、Baird-Parker琼脂、营养肉汤、肠道菌增菌液、麦康凯琼脂、甘露醇卵黄多粘菌素琼脂、SS琼脂、硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)琼脂等均购自青岛海博生物公司,生化鉴定试剂(法国生物梅里埃),副溶血性弧菌诊断血清(11种O血清及K6、K8,日本生研),副溶血性弧菌毒力基因检测试剂(上海辉睿生物科技有限公司);内切酶*Not I*、*Xba I*均购自美国Promega,蛋白酶K(德国MERCK),均在有效期内使用。分子质量参考菌株为沙门菌国际标准菌株H9812,由浙江省疾病预防控制中心提供。

1.2 方法

1.2.1 致病菌检测

按照GB/T 4789.7—2008《食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[3]、GB 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[4]、GB 4789.10—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[5]、GB/T 4789.6—2003《食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验》^[6]、GB/T 4789.14—2003《食品卫生微

生物学检验 蜡样芽胞杆菌检验》^[7]、WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》^[8]附录B的方法。收集样品/标本后立即对样品/标本分别进行直接分离和增菌后分离,挑取可疑菌落分离纯化后进行生化鉴定、血清学分型。

1.2.2 副溶血性弧菌基因检测

按照试剂说明书用荧光定量PCR检测*tdh*、*trh*、*tlh*、*toxR*基因,95℃预变性5 min,95℃变性10 s,58℃退火、延伸及检测荧光45 s,循环40次。循环阈值(Ct)值 ≥ 38 为阴性,Ct值 < 35 为阳性, $35 \leq Ct$ 值 < 38 重复测定两次,若两次Ct值 ≥ 38 则判为阴性,其中一次Ct值 < 38 判为阳性。

1.2.3 PFGE分型

参照食品安全风险监测工作手册中副溶血性弧菌PFGE操作程序进行,用*Not I*内切酶37℃酶切4 h后上机电泳,最小分子量(low MW)-78 kb、最大分子量(high MW)-396 kb,初始转换时间(initial switch time)10 s,终末转换时间(final switch time)35 s,电压梯度(voltage gradient)6 V/cm,夹角(included angle)120°,坡道(ramping):线性(linear),起始电流140 mA。成像后用BioNumerics 6.6软件分析。

2 结果

2.1 致病菌检测结果

20份样品/标本中15份检出副溶血性弧菌,且每份仅检出一株副溶血性弧菌(表1),其中12份患者肛拭子标本中9份检出副溶血性弧菌,且7份为O3:K6血清型,2份为O2群。3份墩板涂抹样品中均检出副溶血性弧菌,2份为O3:K6血清型,1份为O1群;3份剩余食物样品中有2份(凉拌海蛰和猪肚炒青椒)检出副溶血性弧菌,分别为O1群和O10群。厨师肛拭子标本检出O11群副溶血性弧菌;20份样品/标本中均未检出沙门菌、致泻大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌。

2.2 副溶血性弧菌基因检测

15株副溶血性弧菌的*tlh*、*toxR*基因均阳性,*trh*基因均阴性;患者肛拭子标本中7株副溶血性弧菌O3:K6血清型*tdh*基因均阳性,1株O2群*tdh*基因阳性;墩板涂抹样品中检出的2株副溶血性弧菌O3:K6血清型*tdh*基因均阳性,厨师肛拭子标本中检出1株副溶血性弧菌O11群*tdh*基因阳性;剩余食物样品中检出的2株副溶血性弧菌*tdh*基因均阴性。即15株副溶血性弧菌分离株中,11株为*tdh* + *trh*-*tlh* + *toxR* + 基因型,4株为*tdh*-*trh*-*tlh* + *toxR* + 基因型。

表1 20份样品/标本中副溶血性弧菌检测结果(份)

Table 1 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from 20 samples/specimens in this study

种类	检测份数	阳性份数	O3: K6血清型	O1群	O2群	O10群	O11群
患者肛拭子标本	12	9	7	0	2	0	0
厨师肛拭子标本	1	1	0	0	0	0	1
厨师手涂抹样品	1	0	0	0	0	0	0
墩板涂抹样品	3	3	2	1	0	0	0
剩余食物样品	3	2	0	1	0	1	0
合计	20	15	9	2	2	1	1

2.3 副溶血性弧菌 PFGE 聚类分析结果

除剩余食物样品中 O1 群和 O10 群 2 株副溶血性弧菌核酸降解未能分出条带外,患者肛拭子标本、厨师肛拭子标本和墩板涂抹样品中的 13 株副溶血性弧菌分为 5 个型别,7 株患者肛拭子标本和 2 株墩板涂抹样品中的 O3: K6 型副溶血性弧菌带型高度同源,结果见图 1。

PFGE-Not I PFGE-Not I

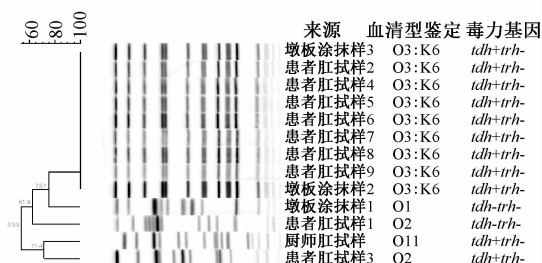


图1 13株副溶血性弧菌 PFGE 聚类树状图

Figure 1 Dendrogram illustrating the clustering of PFGE patterns of the 13 *Vibrio parahaemolyticus* strains examined in this study

3 讨论

副溶血性弧菌是夏秋季细菌性食物中毒的主要病原菌,是在沿海地区食物中毒的首要致病菌。据报道^[9]副溶血性弧菌引发食物中毒的发生规模及人群暴露规模均呈明显上升趋势,目前已成为世界许多沿海国家细菌性食物中毒的首位病原菌。O3: K6型菌株是1996年之后引起世界范围大流行并导致副溶血性弧菌感染人数急剧上升的菌型^[10]。本次事件中检出的副溶血性弧菌也以 O3: K6 血清型为主。

本事件中检出的 15 株副溶血性弧菌 *tlh*、*toxR* 基因阳性率为 100.0% (15/15), *tdh* 基因阳性率为 73.3% (11/15), *trh* 基因均阴性,与其他报道^[2,11-12]接近。*tlh* 基因编码不耐热溶血素(TLH),有物种特异性,*toxR* 基因编码跨膜转录激活蛋白,在弧菌属中普遍存在。副溶血性弧菌的致病机理目前还没有完全研究清楚,但有两个毒力因子已经得到公认^[13],即由 *tdh* 基因编码的耐热直接溶血素(TDH)

和由 *trh* 基因编码的耐热相关溶血素(TRH),TDH 具有溶血活性、细胞毒性、肠毒素性、小鼠心脏毒性及致死性等生物学活性,TRH 具有溶血作用与肠毒素作用。据文献报道^[14]临床分离株大多携带 *tdh*、*trh* 基因中的一种或二者都有,并以 *tdh* 为主,而环境分离株中携带这两种毒力基因的比例相当低。

PFGE 因分辨力高、结果重现性好,能满足不同实验室间结果比较,被推荐用于病原菌的分子流行病学调查和主动监测^[15],TENOVER 等^[16]根据来自同一亲代的个体具有共同的遗传物质,在 PFGE 试验中表现出相同的指纹图谱的原理,认为电泳条带无差异者是相同菌株,有 1~3 条差异者菌株间有相近关系。TALON 等^[17]在解释 PFGE 结果时提出将具有 85% 以上相同条带的菌株认为是相同的菌株。本事件中 7 份患者肛拭子标本和 2 份墩板涂抹样品中 O3: K6 型副溶血性弧菌 PFGE 分型结果显示带型完全相同,相似度 100%,表明这些患者和墩板涂抹样品中的 O3: K6 型溶血性弧菌为高度同源,提示污染源食品通过墩板等用具交叉污染其他食品引起食物中毒,另 2 份患者肛拭子标本中的 O2 群副溶血性弧菌的条带差异较多,PFGE 分型距离较远,提示这两株菌的亲缘关系较远。

厨师自述于喜宴次日有腹痛并腹泻数次,肛拭子标本中检出 O11 群副溶血性弧菌,与患者肛拭子标本中的菌型不一致,且 PFGE 分型条带差异较大,提示不能推断厨师带菌导致本次食物中毒,而厨师可能也是此次事件中的其他型别副溶血性弧菌导致的患者之一。

剩余凉拌海蛰和猪肚炒青椒分离的副溶血性弧菌为 O1 群和 O10 群,与患者肛拭子标本中的菌型不一致,同时因核酸降解致 PFGE 未能分型,所以尚不能断定凉拌海蛰和猪肚炒青椒是本次事件的病因食品。副溶血性弧菌在海水及海水产品中有多种克隆型菌株混合存在,同一样品中分离的多个菌株只有部分属于同一克隆,大部分并不属于同一克隆^[18],因此在食源性疾病的调查溯源中,应挑取多个菌落进行亲缘关系分析,防止误判。目前一般的基层实验室在鉴定时挑几个菌落,但是溯源研究时却仍然只取一个菌株,就存在有漏掉某些基因型

的可能性,最后导致无法溯源。

根据流行病学调查、临床症状和实验室检测结果,以及WS/T 81—1996《副溶血性弧菌食物中毒诊断标准及处理原则》^[19],综合分析认为本次事件是可疑食物交叉污染切菜墩板引起的以O3:K6血清型为主的多种血清型别副溶血性弧菌的食物中毒。

随着经济发展,海产品已是农村喜宴必不可少的菜肴,农村家庭宴席绝大多数是请农村厨师在家中加工,监管相对松散,厨师卫生意识不强,尤其是墩板、刀具、抹布等用具生熟不分,极易引起食源性病原菌的交叉污染,是导致食物中毒事件频发的主要原因之一。建议相关监管部门加强对农村厨师的培训和农村宴席的日常监管,重点在清洗、改刀过程中,用具生熟分开,操作规范,严防交叉污染,建议建立成品菜留样制度,以利于事后原因查找。同时要加强食品卫生知识的宣传工作,尤其是食源性致病菌生物学特性、传播途径等相关知识的普及,提高广大群众的预防意识,减少食物中毒事件的发生。

参考文献

- [1] 方伟,杨杏芬,柯昌文. 副溶血性弧菌分型研究进展[J]. 中华疾病控制杂志,2008,12(5):468-472.
- [2] 杨丽华,陈敏,王小光,等. 上海市闵行地区副溶血性弧菌分子流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(6):523-529.
- [3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验:GB/T 4789.7—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验:GB 4789.4—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验:GB 4789.10—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [6] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 食品卫生微生物学检验 致泻大肠埃希氏菌检验:GB/T 4789.6—

- 2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [7] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. 食品卫生微生物学检验 蜡芽芽胞杆菌检验:GB/T 4789.14—2003[S]. 北京:中国标准出版社,2003.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 感染性腹泻诊断标准:WS 271—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [9] 金培婕,吴蓓蓓,王淑娜,等. 浙江沿海地区海产品及环境中副溶血性弧菌分离与主要毒力基因分析[J]. 微生物学通报,2009,36(7):962-967.
- [10] 曲梅,张新,刘桂荣,等. 北京市副溶血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.
- [11] 沙丹,刁保卫,肖勇,等. 2009—2011年无锡市副溶血性弧菌分离菌株的毒力检测及PFGE分析[J]. 中国病原生物学杂志,2012,7(7):507-509.
- [12] 杨月莲,于志刚,刘辉,等. 引起一起食物中毒的副溶血性弧菌病原学检测和分子分型溯源研究[J]. 中国病原生物学杂志,2013,8(9):827-829,845.
- [13] ZHANG X H, AUSTIN B. Haemolysins in *Vibrio* species[J]. J Appl Microbiol,2005,98(5):1011-1019.
- [14] 陈茂义,胡婕,陈婷,等. 荆州市不同来源副溶血性弧菌毒力基因分布及分子分型研究[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(2):231-235.
- [15] LU P L, CHANG S C, PAN H J, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the investigation of a nosocomial outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2000, 33(1): 39-33.
- [16] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [17] TALON D, CAILLEAUX V, THOUVEREZ M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of pseudomonas aeruginosa [J]. J Hop Infection, 1996, 32(2): 135-145.
- [18] 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.
- [19] 中华人民共和国卫生部. 副溶血性弧菌食物中毒诊断标准及处理原则:WS/T 81—1996 [S]. 北京:中国标准出版社,1996.