

风险监测

2018年广州市水产品中创伤弧菌和河弧菌检测分析

张晶,和鹏,周勇,陶霞,白志军,吴新伟

(广州市疾病预防控制中心,广东 广州 510440)

摘要:目的 了解为期一年的监测中广州市水产品创伤弧菌和河弧菌污染水平、菌株携带毒力基因和分子分型情况。方法 对广州市水产品中创伤弧菌和河弧菌进行分离鉴定,毒力基因鉴定和肠道细菌基因间重复序列聚合酶链式反应(Eric-PCR)。结果 创伤弧菌阳性率为10.4%(31/298),河弧菌为5.0%(15/298);用PCR法检测创伤弧菌毒力溶血素基因 vhA 全部阳性, $vcgC/E$ 和16S rRNA A/B分型结果显示,共有CB型、EA型和CA型3种基因型别。河弧菌毒力相关基因 vfh 、 $toxR$ 全部阳性, $hupO$ 携带率为60.0%(9/15)、 vfp 携带率为80.0%(12/15);Eric-PCR扩增出8~14条100~2 000 bp之间的条带,将15株河弧菌在相似系数为0.8处分为5个群11个类型。结论 广州市水产品中创伤弧菌和河弧菌污染情况较严重,大部分菌株携带毒力基因,Eric-PCR结果显示15株河弧菌在亲缘关系上具有相关性,应加强防控。

关键词:创伤弧菌;河弧菌;毒力基因;肠道细菌基因间重复序列聚合酶链式反应

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)06-0570-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.06.013

Detection and characterization of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvibrio* in aquatic products of Guangzhou, 2018

ZHANG Jing, HE Peng, ZHOU Yong, TAO Xia, BAI Zhijun, WU Xinwei

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

Abstract: Objective To investigate the contamination, virulence-associated genes and molecular typing of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvibrio* in aquatic products of Guangzhou City. **Methods** *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvibrio* suspected isolates were further identified by VITEK-2 system and polymerase chain reaction (PCR). The virulence-associated genes of the *Vibrio* isolates were determined, and genotyping analysis was performed by enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (Eric-PCR). **Results** The positive rates were 10.4% (31/298) and 5.0% (15/298) for *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvibrio*. Three genotypes of *Vibrio vulnificus* were detected, including CB, EA and CA. The virulence-associated genes vfh and $toxR$ of *Vibrio fluvibrio* were all positive, the detection rate of $hupO$ was 60.0% (9/15) and vfp was 80.0% (12/15). Eric-PCR amplified 8-14 bands between 100-2 000 bp, and 15 *Vibrio fluvibrio* strains were divided into 5 groups and 11 types with a similarity coefficient of 0.8. **Conclusion** The contamination of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvibrio* in aquatic products in Guangzhou was serious, and most virulence-associated genes were present. Eric-PCR result showed that 15 *Vibrio vulnificus* strains were related to each other in genetic relationship, so prevention and control should be strengthened.

Key words: *Vibrio vulnificus*; *Vibrio fluvibrio*; virulence-associated genes; enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和河弧菌(*Vibrio fluvialis*)是重要的致病性弧菌^[1]。创伤弧菌具有低度嗜盐性,是分布极广的海洋弧菌,人类通常由于

食用污染的水产品、通过伤口接触海水及海产品或加工海产品时被刺伤而感染,导致急性胃肠炎、原发性脓毒血症及坏死性筋膜炎,起病凶险,肝病患者或免疫力低下人群感染后病死率可高达50%^[2]。河弧菌常存在于河流或近海,引起腹泻和败血症(伤口暴露及免疫力低下人群),在致病性弧菌中的危害性仅次于霍乱弧菌和副溶血性弧菌^[3]。近年来关于创伤弧菌和河弧菌感染致病的报道逐年增多^[4-7],监测水产品中这两种弧菌并研究其生物学特性对于食源性疾病暴发事件中菌株的溯源、预防

收稿日期:2019-10-12

基金项目:广州市医药卫生科技项目(20171A011274);广东省科技计划项目(2016A020215217);广州市科技计划项目(201707010130);广州市医学重点学科建设项目(2017-2019-07)

作者简介:张晶 女 副主任技师 研究方向为病原微生物学
E-mail:zhangjing9468@sina.cn

和控制意义重大。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2018年在广州市农贸市场和超市采集的包括淡水鱼、小龙虾和海水鱼、虾、贝类产品共298份。采集样品4℃保存,24h内送至实验室检测。

1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定/药敏分析系统(法国梅里埃),AB基因扩增仪(美国赛默飞),电泳仪、凝胶电泳成像系统均购自美国伯乐。

创伤弧菌、河弧菌荧光定量试剂盒均购自深圳生科源,弧菌显色培养基(广州环凯微生物科技有限公司),GN细菌鉴定卡(法国梅里埃),培养基和

试剂盒均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定

根据《广东省食品安全风险监测工作手册》的方法进行定性检测,阳性菌株经VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定/药敏分析系统和创伤弧菌、河弧菌荧光定量试剂盒确认。

1.2.2 基因检测

DNA模板制备:用菌环挑取单菌落于100 μl无菌去离子水中,置沸水浴裂解10 min,冰浴10 min,8 000 r/min离心10 min(离心半径为5 cm)后取上清。创伤弧菌 *vvhA* 溶血素基因,毒力相关基因 *vcg*、16S rRNA和血清E型及生物II型扩增引物,河弧菌毒力相关基因 *vfh*、*hupO*、*vfp*和 *toxR*的扩增引物见表1。

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

| 目的基因 | 引物序列(5'-3') | 片段大小/bp | 反应条件 |
|-------------|---------------------------|---------|---|
| <i>vvhA</i> | CCGCGGTACAGGTTGGCGCA | 519 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 62℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 25个循环; 72℃延伸5 min |
| | CGCCACCCACTTTCGGGCC | | |
| <i>vcgC</i> | AGTCCCGATAGCGATCT | 97 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸5 min |
| | TGAGCTAACCGAGTAGTGAG | | |
| <i>vcgE</i> | CTCAGAAAGGCTGAATTGAC | 199 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸5 min |
| | GATTAACGCTGTAAGGCCG | | |
| 16S rRNA A | CATGATAGCTTCGGTCAA | 285 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 58℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸5 min |
| | CACTACCACCTTCTCACGAC | | |
| 16S rRNA B | GCCTACGGGCCAAAGAGG | 839 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 58℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸5 min |
| | CCTGCGTCTCCGCTGGCT | | |
| <i>SerE</i> | TGTTGTTCTTGCCCACTCTC | 665 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 64℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸5 min |
| | CGCGCTTAGATTTGTCTCAC | | |
| <i>Bt2</i> | AGAGATGGAAGAAACAGGCC | 344 | 94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 64℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃延伸5 min |
| | GGACAGATATAAGGCCAAATGG | | |
| <i>vfh</i> | GCGGTCAGTGGTGGTGAAG | 800 | 94℃预变性4 min; 94℃变性40 s, 61℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 33个循环; 72℃延伸6 min |
| | TCCGTCGAACCGCTCTCGCTT | | |
| <i>vfp</i> | TACAACGTCAAGTTAAAGGC | 1 790 | 94℃预变性4 min; 94℃变性40 s, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 33个循环; 72℃延伸6 min |
| | GTAGGCGCTGTAGCCTTTCA | | |
| <i>hupO</i> | ATTACGCACAACGAGTGAAC | 600 | 94℃预变性4 min; 94℃变性40 s, 56℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 33个循环; 72℃延伸6 min |
| | ATTGAGATGGTAAACAGCGCC | | |
| <i>toxR</i> | GACCAGGCTTTGAGGTGGACGAC | 217 | 94℃预变性4 min; 94℃变性40 s, 65℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 33个循环; 72℃延伸6 min |
| | AGGATACGGCACTTGAGTAAGACTC | | |
| <i>Eric</i> | ATGTAAGCTCTGGGATTCAC | Several | 95℃预变性7 min; 95℃变性1 min, 52℃退火1 min, 65℃延伸8 min, 30个循环; 65℃延伸10 min |
| | AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG | | |

1.2.3 Eric-PCR分型

肠道细菌基因间重复序列聚合酶链式反应(enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR, Eric-PCR)基于肠内细菌基因组间重复序列获得基因指纹图谱并分析其生物学关系。Eric-PCR扩增引物见表1。每组重复试验3次,将获得的重复性好的Eric-PCR指纹图谱数据根据同一电泳位置条带有无记为“1”和“0”,然后转换成二进制,用SPSS v 21软件分析,聚类分析利用非加权组平均(unweighted pair-group method with arithmetic

means, UPGMA)法,以Dice系数对扩增产物进行相似性分析,用Simpson多样性指数(D)测定评估Eric-PCR的判别能力。

2 结果

2.1 菌株检出情况

2018年共采集淡水产品108份,海水产品190份,每份样品每种菌只检一株,其中检出创伤弧菌31株,检出率为10.4%,河弧菌15株,检出率为5.0%,见表2。

表 2 广州市水产品中创伤弧菌和河弧菌检出情况

Table 2 Distribution of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio fluvialis*

isolated from aquatic products

| 样品 | 样品份数 | 创伤弧菌 | | 河弧菌 | |
|-----|------|-------|-------|-------|-------|
| | | 阳性菌株数 | 检出率/% | 阳性菌株数 | 检出率/% |
| 贝类 | 70 | 13 | 18.6 | 0 | 0.0 |
| 海鱼 | 60 | 4 | 6.7 | 6 | 10.0 |
| 海虾 | 60 | 7 | 11.7 | 0 | 0.0 |
| 淡水鱼 | 95 | 7 | 7.4 | 8 | 8.4 |
| 小龙虾 | 13 | 0 | 0.0 | 1 | 7.7 |
| 合计 | 298 | 31 | 10.4 | 15 | 5.0 |

2.2 毒力相关基因分析

31 株创伤弧菌全部检出溶血素 A 基因 (*vhA*) 核酸阳性,其中 25 株鸟氨酸脱羧酶和吡啶阳性,为生物 1 型 (BT1),其余 6 株为生物 2 型 (BT2),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) 有 17 株,*vcgE* 和 16S rRNA A (EA 型) 有 12 株,*vcgC* 和 16S rRNA A 型 (CA 型) 有 2 株,*vcgC* 和 16S rRNA AB 型 (CAB 型) 未检出,*vcgE* 和 16S rRNA B 型 (EB 型) 未检出。各型别之间经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 9.212, P < 0.01$)。毒力相关基因以 CB 型 (54.8%, 17/31) 和 EA 型 (38.7%, 12/31) 为主 (图 1)。与淡水产品比较,海水产品中毒力相关基因占 77.4% (24/31)。

15 株河流弧菌均检出溶血素基因 *vfh* 和毒力基因调控蛋白 *toxR*;9 株检出携带亚铁血红素利用蛋白基因 *hupO* (60.0%, 9/15);12 株检出携带金属蛋白酶基因 *vfp* (80.0%, 12/15)。各毒力基因在水产品中的分布见图 2。

2.3 Eric-PCR 图谱分析

如图 3 所示,用单一扩增法研究 15 株河弧菌 Eric-PCR 序列扩增模式,每株能扩增出 8~14 条条带,大小在 100~2 000 bp 之间,Simpson 多样性指数

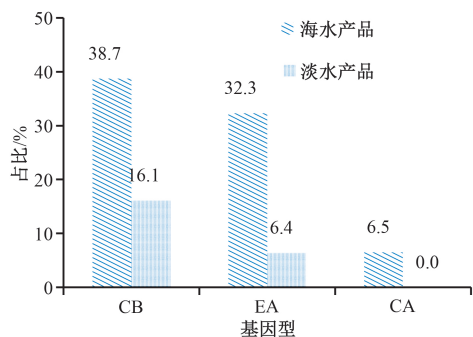


图 1 *VcgC/E* 和 16S rRNA A/B 毒力相关基因分型
Figure 1 Distribution of *vcgC/E* 和 16S rRNA A/B virulence-associated genes in *Vibrio vulnificus* isolates recovered from aquatic products

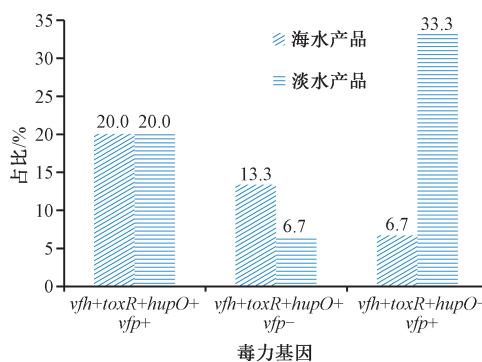


图 2 河弧菌毒力基因分布情况

Figure 2 Distribution of virulence-associated genes in *Vibrio fluvialis* isolates recovered from aquatic products

(D) 值为 0.765 8,呈现不同程度的基因多样性。运用 NTSYS-PC 2.0 软件进行聚类分析,在相似系数为 0.8 处同源性最高可分为 5 个群 11 个类型,海水产品中分离的河弧菌主要分布在 I 群和 II 群,淡水产品中分离的河弧菌则主要分布在 IV 群和 V 群。总体上结果具有遗传相关性。从图 3 中还可以看出,15 株河弧菌 Eric-PCR 图谱聚集性与毒力基因型相关性不大,相同毒力基因型的菌株可获得

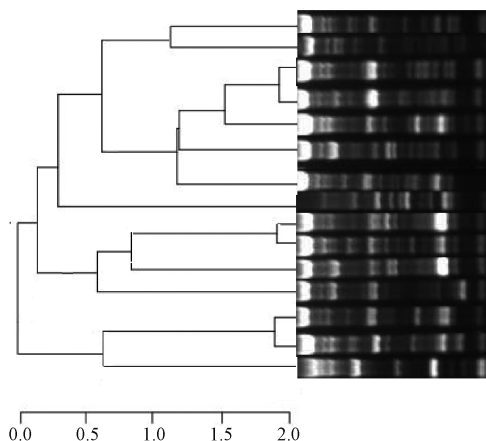


图 3 15 株河弧菌的 Eric-PCR 图谱及聚类分析

Figure 3 Eric-PCR and clustering analysis of 15 strains of *Vibrio fluvialis*

| 编号 | 毒力基因 | 样品来源 | 分布 |
|------|---------------------------|------|-------|
| vf11 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp-</i> | 海水产品 | I 群 |
| vf3 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp-</i> | 海水产品 | I 群 |
| vf5 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp+</i> | 海水产品 | II 群 |
| vf4 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp+</i> | 海水产品 | II 群 |
| vf10 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp+</i> | 海水产品 | II 群 |
| vf12 | <i>vfh+toxR+hupO-vfp+</i> | 海水产品 | II 群 |
| vf15 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp-</i> | 淡水产品 | II 群 |
| vf13 | <i>vfh+toxR+hupO-vfp+</i> | 淡水产品 | III 群 |
| vf9 | <i>vfh+toxR+hupO-vfp+</i> | 淡水产品 | IV 群 |
| vf7 | <i>vfh+toxR+hupO-vfp+</i> | 淡水产品 | IV 群 |
| vf1 | <i>vfh+toxR+hupO-vfp+</i> | 淡水产品 | IV 群 |
| vf8 | <i>vfh+toxR+hupO-vfp+</i> | 淡水产品 | IV 群 |
| vf6 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp+</i> | 淡水产品 | V 群 |
| vf2 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp+</i> | 淡水产品 | V 群 |
| vf14 | <i>vfh+toxR+hupO+vfp+</i> | 淡水产品 | V 群 |

不同的图谱,不同毒力基因型的菌株有相近的指纹图谱。Eric-PCR 扩增 31 株创伤弧菌,未见条带或者只有一条条带,不能进行有效分型。

3 讨论

创伤弧菌和河弧菌均为嗜温性弧菌,随着温室效应全球化,弧菌的流行区域和危害性也逐年增大^[8-9],广州市近年陆续有关于创伤弧菌和河弧菌感染的报道。由于弧菌的嗜铁性,酒精性肝病和慢性肝炎等机体转铁蛋白较高的患者易感性增加,且感染后容易引发重症。我国是肝炎大国,预测由创伤弧菌和河弧菌引起的免疫力低下人群疾病负担的发生率将进一步升高^[10-12]。

本次监测发现,市售水产品中创伤弧菌和河弧菌检出率与其他沿海地区相似^[13],分别为 10.4% 和 5.0%。在淡水产品中还检出创伤弧菌,考虑为交叉感染引起。创伤弧菌分为 3 种生物型,其中生物 1 型能够导致人类发病,未检测到血清 E 型。毒力相关基因 *vcgC/E* 和 16S rRNA A/B 分型显示以 CB 型和 EA 型为主,高达 54.8% 和 38.7%,提示广州市市售水产品中创伤弧菌危害性高,应引起关注。本次监测分离到的 15 株河弧菌中,具有种属特异性的 *vfh* 和 *toxR* 检出率均为 100.0%,*hupO* 检出率为 60.0%,*vfp* 检出率为 80.0%。这些毒力基因具有一定程度的保守性,是细菌耐受环境改变以及感染宿主细胞的相关基础基因;因此,应持续监测这两种弧菌的污染情况,进一步研究毒力基因突变的地理特征及其与基因型的关系,对于制定弧菌的防控策略及分析毒力基因的具体作用有重要的参考价值。

Eric-PCR 是一种可靠的分型方法,它利用穿插在肠道细菌基因组重复序列的基因为引物,建立起特异性的 DNA 指纹图谱分类的方法^[14]。不同菌株的 Eric-PCR 基因组指纹图谱可以显示出种、属和菌株水平上的差异。本研究中,相似系数为 0.8 处可分为 5 个群 11 个类型,Ⅰ群有 2 株,Ⅱ群有 5 株,Ⅲ群有 1 株,Ⅳ群有 4 株,Ⅴ群有 3 株,将毒力基因相同的菌株很好地聚类在同一个群里,显示出 Eric-PCR 在河弧菌上可靠的分型能力。这些群内具有遗传相关性的菌株在电泳图谱上所显示出来的细微差别,可能是同一起来源的菌株在扩散过程中发生了变异,因此没有完全一致。本研究采用 Eric-PCR 分析广州市市售水产品中污染的河弧菌菌株的同源性,分析结果揭示了毒力基因和样品类型等菌株间内在联系,结合流行病学分析,有利于实现对河弧菌的主动监测和疾病暴发因子溯源,这对防控由

河弧菌引起的食源性疾病具有重要意义。本研究中尽管创伤弧菌毒力基因型之间存在统计学上的相关性,但是利用 Eric-PCR 对 31 株创伤弧菌基因组 DNA 进行分析,未能得到或只能得到一条条带,没有足够的分辨能力进行分类,需要今后进一步深入研究,通过大规模的基因组测序分析比较重复 DNA 序列在创伤弧菌中的分布及所起作用。

参考文献

- [1] TORRESI M, SPERANDII A, RICCI L, et al. Detection and characterisation of potentially pathogenic species of *Vibrio* in the Vibrata river, Abruzzo Region, Italy [J]. *Vet Ital*, 2018, 54 (2): 125-135.
- [2] YUN N R, KIM D M. *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health [J]. *Korean J Intern Med*, 2018, 33(6): 1070-1078.
- [3] 周妍妍, 闫东辉, 苏建荣. 临床分离河流弧菌毒力及药敏表型特征分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(5): 492-495.
- [4] KUO CHOU T N, CHAO W N, YANG C, et al. Predictors of mortality in skin and soft-tissue infections caused by *Vibrio vulnificus* [J]. *World J Surg*, 2010, 34(7): 1669-1675.
- [5] LI L H, WANG L Y, ZHANG C H, et al. A case of *Vibrio vulnificus* related wound infection diagnosed by next-generation sequencing [J]. *IDCases*, 2019, 15: e00497.
- [6] 周文俊, 袁红萍, 赵宏. 血液和胸水中同时检出河流弧菌 1 例 [J]. *临床医药文献杂志*, 2017, 4(26): 5126.
- [7] RAJPARA N, NAIR M, BHARDWAJ A K. A highly promiscuous integron, plasmids, extended spectrum Beta lactamases and efflux pumps as factors governing multidrug resistance in a highly drug resistant *Vibrio fluvialis* isolate BD146 from Kolkata, India [J]. *Indian J Microbiol*, 2018, 58 (1): 60-67.
- [8] PHILLIPS K E, SATCHELL K J F. *Vibrio vulnificus*: from oyster colonist to human pathogen [J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13 (1): e1006053.
- [9] GUZMÁN-HERNÁNDEZ R, HERNÁNDEZ-VÉLEZ R, CONTRERAS-RODRÍGUEZ Á. *Vibrio fluvialis* [J]. *Rev Chilena Infectol*, 2016, 33(4): 455-456.
- [10] 洪广亮, 卢中秋. 慢性肝病患者并发创伤弧菌脓毒症研究现状 [J]. *中国微生态学杂志*, 2007, 19(2): 236-238.
- [11] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review [J]. *Food Microbiol*, 2016, 57(2): 128-134.
- [12] IGBINOSA E O, OKOH A I. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7(10): 3628-3643.
- [13] 吴斌, 马杰, 林维宣. 水产品中致病性弧菌的分离与鉴定 [J]. *大连轻工业学院学报*, 2003, 22(1): 47-49.
- [14] OLIVE D M, BEAN P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1661-1669.