

北京市副溶血弧菌病原学和分子流行病学特征分析

曲梅 张新 刘桂荣 黄瑛 李洁 李锡太 刘元 严寒秋
刘白微 黎新宇 王全意 黄芳

【摘要】 目的 了解北京市副溶血弧菌腹泻病例分离株的病原学和分子流行病学特征。方法 2010 年 4—12 月从临床收集散发腹泻病例 2118 份粪便标本,进行副溶血弧菌的分离培养、生化鉴定。阳性菌株进行血清分型;采用药敏纸片法对 12 种抗生素进行敏感性检测;用实时荧光定量 PCR 方法检测毒力基因 *tlh*、*tdh* 和 *trh*;用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 进行分子分型。结果 2118 份粪便标本分离出副溶血弧菌 114 株,阳性分离率为 5.38%。114 株副溶血弧菌分属于 23 种血清型,其中 O3 : K6 为优势血清型,占 63.16%。临床分离株对氨苄西林和庆大霉素产生耐药;对阿莫西林、头孢曲松、氯霉素、亚胺培南、萘啶酸和四环素等均具有较高敏感性。全部菌株 *tlh* 基因阳性;*tdh* 存在于大部分菌株中,所占比例为 93.86%;只有 1 株菌 *trh* 阳性。O3 : K6 型菌株 *tdh* 基因阳性率 (98.61%) 明显高于非 O3 : K6 型菌株 (85.71%) ($P=0.0098$)。114 株副溶血弧菌分成 54 种 PFGE 型别,72 株 O3 : K6 型菌株分成 34 种 PFGE 型别,带型分散,无明显聚集性。结论 北京地区感染性腹泻病例副溶血弧菌分离株以 O3 : K6 型为主。毒力基因 *tlh* 和 *tdh* 携带率高,且 O3 : K6 型临床分离株毒力更强。副溶血弧菌对多数抗生素均具有较高敏感性。PFGE 结果提示北京地区流行的副溶血弧菌存在多克隆来源。

【关键词】 副溶血弧菌;病原学;分子分型

Analysis on the etiological and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Beijing QU Mei, ZHANG Xin, LIU Gui-rong, HUANG Ying, LI Jie, LI Xi-tai, LIU Yuan, YAN Han-qiu, LIU Bai-wei, LI Xin-yu, WANG Quan-yi, HUANG Fang. *Control of Endemic Infectious Diseases, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China*
Corresponding author: HUANG Fang, Email: hfxdd1775@yahoo.com.cn

This work was supported by grants from the Project of Beijing Science and Technology New Stars (No. 2008B28) and National Science and Technology Support Projects for the "Eleventh Five-Year Plan" for Infectious Diseases of China (No. 2008ZX10004-008, 2008ZX10004-002).

【Abstract】 **Objective** To understand the etiological and molecular-epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Beijing. **Methods** Stool specimens from sporadic diarrheal patients were collected during April to December, 2010. Culture and serotyping were used to detect the *Vibrio parahaemolyticus* from the 2118 specimens. All the positive strains were tested for drug sensitivity by Kirby-Bauer method. Real-time PCR was used to detect the existence of three virulence genes *tlh*, *tdh* and *trh*. Molecular typing on *Vibrio parahaemolyticus* isolates was completed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** 114 out of the 2118 specimens were *Vibrio parahaemolyticus* positive, with the positive rate as 5.38%. 114 isolates belonged to 23 serotypes, with the dominant (63.16%) serotype as O3 : K6. Strains isolated from clinical manifestation patients were resistant to antibiotics-ampicillin and gentamicin, while with high sensitivity to amoxicillin, ceftriaxone, chloromycetin, imipenem, nalidixic acid and tetracycline. Virulence gene detection was positive to *tlh* for all the strains, but most to *tdh*, while only one strain to *trh*. The positive rate of *tdh* among O3 : K6 strains (98.61%) was higher than that in those non-O3 : K6 strains (85.71%) ($P=0.0098$). 114 isolates were discriminated into 54 different PFGE patterns, while 72 O3 : K6 strains into 34 patterns without the clustering characteristic. **Conclusion** *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.12.017

基金项目:北京市科技新星计划项目(2008B28);“十一五”传染病国家科技重大专项(2008ZX10004-008, 2008ZX10004-002)

作者单位:100013 北京市疾病预防控制中心传染病地方病控制所

通信作者:黄芳, Email: hfxdd1775@yahoo.com.cn

diarrheal patients in Beijing were dominated by O3 : K6 strains, with stronger virulence. The positive rates of genes *tlh* and *tdh* were high. *Vibrio parahaemolyticus* strains showed high sensitivity to most antibiotics. The prevalent *Vibrio parahaemolyticus* strains in Beijing had various sources of clones.

【Key words】 *Vibrio parahaemolyticus*; Etiology; Molecular typing

副溶血弧菌能产生与其致病性密切相关的 3 种溶血毒素,分别是耐热直接溶血素(TDH)、耐热相关溶血素(TLH)和不耐热溶血素(TRH)^[1-3]。为了解北京地区副溶血弧菌在感染性腹泻人群中的分布,了解其致病性、耐药性、毒力基因的携带情况及分子病原学特征,本研究对北京市 2010 年 13 家监测医院收集到的感染性腹泻监测病例的粪便标本进行副溶血弧菌检测及病原学分析。

材料与方法

1. 标本来源与鉴定:

(1)标本来源:2010 年 4—12 月,在北京市 6 个监测区(县)选取 13 家哨点医院,每个监测区(县)每周采集 10~15 份感染性腹泻病例新鲜粪便标本,共收集到 2118 份标本。

(2)分离培养和生化鉴定:分离培养参照卫生部行业标准 WS 271-2007 附录 B.3 进行。病例的粪便或肛拭子接种于 10 ml 3%NaCl 碱性胨水中,37 °C 培养 6 h。增菌液划线接种于科玛嘉弧菌显色琼脂平板,置 37 °C 培养 24 h。挑取可疑菌落,采用法国生物梅里埃公司 VITEK32 全自动微生物鉴定系统进行系统生化鉴定。实验所用标准参考菌株为 ATCC17802。所需生化培养基和生化试剂均购自北京友康公司和北京陆桥公司。

(3)血清学分型:副溶血弧菌的血清分型采用日本生研公司产品。该血清分为 11 个 O 抗原血清,71 个 K 抗原血清。方法为取一定量细菌于 3%NaCl 盐水中,121 °C 灭菌 30 min,离心(4000 r/min, 10 min),弃上清,用生理盐水洗涤 3 次。取菌体,进行 O 抗原血清凝集试验。K 抗原鉴定:直接取浓菌悬液与多价抗 K 血清按适当比例混合,出现凝集反应时再用单个抗血清进行检测。用生理盐水作为对照。

2. 药敏试验:采用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的 Kirby-Bauer 法,药敏纸片及 MH 培养基均为英国 OXIOD 公司产品。选用的 10 类 12 种代表药物分别为:氨苄西林、头孢曲松、头孢噻吩、氯霉素、环丙沙星、阿莫西林/克拉维酸、甲氧苄氨嘧啶、妥布霉素、庆大霉素、亚胺培南、萘啶酸、四环素。大肠埃希氏菌 ATCC25922 为质控菌株。

3. 荧光定量 PCR 方法检测毒力基因 *tlh*、*tdh* 和

trh: ①模板制备:在新鲜制备的普通营养琼脂上挑取单菌落,置于 100 μl DEPC 水中,95 °C 加热 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清。②引物与探针:*tlh*-F: TGT GGT TGT ATG AGA AGC GAT TG, *tlh*-R: ACG TTA TCC GTC AGC GTT GTG, *tlh*-P: FAM-TGT CTG CGT TCT CGT TCG CCA AAT CT- TAMRA; *tdh*-F: AAT GGT TGA CAT CCT ACA TGA CTG, *tdh*-R: TTT ACG AAC ACA GCA GAA TGA CC, *tdh*-P: FAM-TTC CTT CTC CAG GTT CGG ATG AGC TAC T-TAMRA; *trh*-F: GAT TGC GTT AAC TGG TGA TTC AG, *trh*-R: GCG ATT GAT CTA CCA TCC ATA CC, *trh*-P: FAM-TTC CTT CTC CAG GTT CGG ATG AGC TAC T-TAMRA。③荧光定量 PCR 反应:25 μl 反应体系:12.5 μl 2×PCR 反应混合物,上下游引物各 0.2 μmol/L, TaqMan 探针 0.2 μmol/L, 模板 DNA 2 μl。PCR 反应条件:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 1 min,40 个循环。*Ct* 值在 10~30 为诊断阳性。荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司的 ABI7500, 荧光探针及引物由大连宝生物公司合成,PCR 试剂为 ABI 产品。

4. 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型:参照中国疾病预防控制中心传染病预防控制所制定的标准分型方法,对 114 株副溶血弧菌进行分子分型。沙门菌标准株 H9812 作为分子量标记。副溶血弧菌采用内切酶 *Sfi* I (50 U),50 °C 酶切 4 h 以上;沙门菌标准株 H9812 采用内切酶 *Xba* I (40 U),37 °C 酶切 2 h 以上。电泳条件:电压 6 V/cm,脉冲 12.55~30.82 s,线性转换,转换角度 120°,电泳 19 h,电泳温度 14 °C。脉冲场凝胶电泳仪为美国 Bio-Rad 公司的 CHEF III;凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司的 Gel-DOCXR。内切酶购自 New England 公司。采用 BioNumerics 软件对电泳图像进行分析。

结 果

1. 血清型分布:共检测腹泻病例粪便标本 2118 份,分离到 114 株副溶血弧菌,阳性检出率为 5.38%。114 株副溶血弧菌分为 23 种不同的血清型,包括 7 种 O 型,13 种 K 型。以 O3 : K6 型为主,共 72 株菌,所占比例为 63.16%;其他血清型包括 O1 : K6、

O1 : K25、O1 : K36、O2 : K3、O2 : K6、O3 : K5、O3 : K13、O3 : K29、O3 : K68、O4 : K4、O4 : K6、O4 : K8、O4 : K9、O4 : K13、O4 : K46、O4 : K68、O5 : K6、O6 : K18、O7 : K6 等, 每种血清型都比较分散, 菌株数不超过 5 株。另外还包括 O 群凝集而 K 群不凝集的 O2 : KUT、O3 : KUT、O4 : KUT 各 1 株。

2. 毒力基因分布: 用荧光定量 PCR 方法对 114 株菌进行 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 毒力基因检测, 其中 *tlh* 基因存在于全部菌株中; *tdh* 存在于大部分菌株中, 114 株菌中 107 株 (93.86%) 菌 *tdh* 基因阳性; 只有 1 株菌 *trh* 基因阳性, 其血清型为 O6 : K18。114 株菌中, 106 株 (92.52%) 为 *tlh*⁺*tdh*⁺*trh*⁻, 1 株 (0.94%) 为 *tlh*⁺*tdh*⁺*trh*⁺, 其余 7 株为 *tlh*⁺*tdh*⁻*trh*⁻。*tdh* 基因在 O3 : K6 菌株和非 O3 : K6 菌株的携带率分别为 98.61% (71/72) 和 85.71% (36/42), 前者的阳性比例更高, 经 Fisher 精确检验, 差异有统计学意义 ($P=0.0098$)。

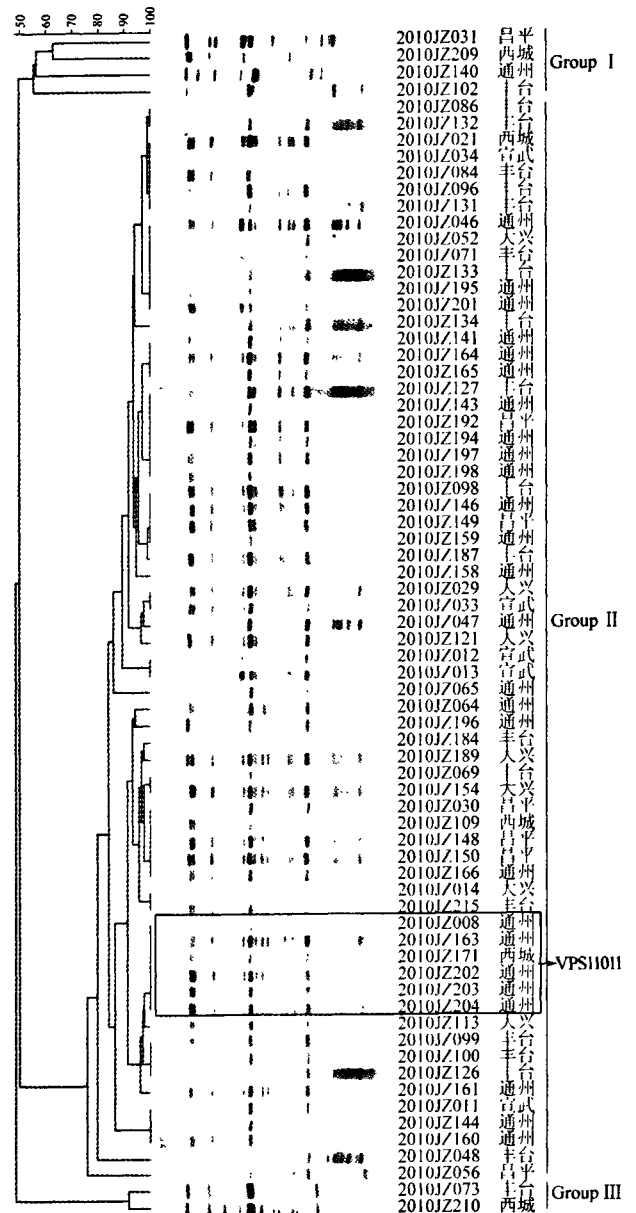
3. 抗生素敏感性: 113 株副溶血弧菌对阿莫西林/克拉维酸敏感率最高, 为 99.12%, 其次是头孢曲松、氯霉素、亚胺培南、萘啶酸和四环素, 敏感率均超过 90.00%; 敏感率最低的药物为庆大霉素, 其次是头孢噻吩和妥布霉素, 分别为 14.02%、49.53% 和 58.88%。对氨苄西林的耐药率最高, 为 96.26%; 庆大霉素为 33.64%, 对其他抗生素的耐药率均低于 4% (表 1), 但也存在多重耐药株。

表 1 北京市 114 株副溶血弧菌对各类抗生素敏感性

抗生素	敏感	中度敏感	耐药
氨苄西林	2(1.87)	2(1.87)	110(96.26)
阿莫西林/克拉维酸	113(99.12)	1(0.88)	0
萘啶酸	108(94.39)	4(3.74)	2(1.87)
环丙沙星	85(74.76)	27(23.36)	2(1.87)
头孢噻吩(一代)	56(49.53)	43(37.38)	15(13.08)
头孢曲松(三代)	111(97.19)	1(0.93)	2(1.87)
氯霉素	110(96.26)	3(2.80)	1(0.93)
庆大霉素	16(14.02)	60(52.34)	38(33.64)
妥布霉素	67(58.88)	36(31.78)	11(9.35)
甲氧苄氨嘧啶	76(66.35)	38(33.64)	0
四环素	105(92.52)	4(3.74)	4(3.74)
亚胺培南	110(96.26)	2(1.87)	2(1.87)

注: 括号外数据为菌株数, 括号内数据为百分比 (%)

4. PFGE 分型: 经 *Sfi* I 酶切, 114 株副溶血弧菌产生 54 种 PFGE 型别。72 株 O3 : K6 型菌株分成 34 种 PFGE 型别 (图 1), 总体相似度不到 50.0%, 带型分散, 每种带型所包含的菌株最多不超过 6 株。各带型间无地区和时间分布差异。按照相似程度, 聚类成 3 大克隆群。其中 Group II 包含 28 种带型, 图谱



注: 黑色方框内的菌株属于同一带型 VPS11011

图 1 北京市 114 株副溶血弧菌 *Sfi* I 酶切的 PFGE 聚类图

条带和位置的差异相对较小, 各带型间遗传相似度高, 属于来源相近的克隆进化而来, 与 Group I 和 Group III 遗传距离较远; 有 4 种带型包含 5 株以上散发菌株, 其中 VPS11011 带型有 3 株菌分离自同一家医院发病日期相差 3 d 的散发腹泻病例, 其他血清型菌株形成的 PFGE 型别则较为散在。

讨论

北京地区副溶血弧菌在散发腹泻病例中的检出率为 5.38%, 位于当年病原菌检出率的第二位^[4], 成为本地区引起感染性腹泻的主要致病菌之一。绝大多数临床分离株为 *tdh*⁺*trh*⁻ 菌株, 只有 1 株 *tdh*⁺*trh*⁺ 菌

株,少数 tdh^-trh^- 菌株,未发现 tdh^-trh^+ 菌株,与王艺等^[5]研究结果类似,带有 tdh 基因的菌株致病力和感染性较强。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弧菌感染人数急剧上升的克隆群。本研究结果显示北京市散发病例感染的副溶血弧菌以O3:K6型为主,且O3:K6型菌株 tdh 基因的携带率要明显高于非O3:K6型菌株。这一结果从毒力因子角度证实Yeung等^[6]报道的O3:K6型副溶血弧菌可能比其他血清型更能导致腹泻和感染。不同地区、不同来源副溶血弧菌流行株的血清型不同,且不同血清型的菌株对人和水产动物的致病性有一定的差异性^[7]。因此,长期、持续监测副溶血弧菌,对其血清型进行鉴定和分析,对于揭示其流行规律,预防和控制其在人群间的感染和传播具有重要意义。

副溶血弧菌对氨苄西林和庆大霉素的耐药性比较高。其中氨苄西林的耐药率达到96.26%,表明从病例中分离的副溶血弧菌对青霉素类药物是高度耐药的,庆大霉素属于氨基糖苷类药物,已达到中度耐药。而对于 β -内酰胺类药物、三代头孢、碳青霉烯类、喹诺酮类和四环素类等药物都高度敏感,尤其是 β -内酰胺类药物敏感率最高,且没有耐药株的出现。因此,临床治疗由副溶血弧菌引起的感染性腹泻时,应首选以阿莫西林/克拉维酸为代表的 β -内酰胺类药物,其次可考虑三代头孢、碳青霉烯类、喹诺酮类和四环素类等其他药物。

PFGE作为菌株基因组指纹图谱的分析手段,具有更高的分辨率,可以分析同一时段内不同地区散在分布的菌株之间内在差异和联系。本研究将114株散发人源副溶血弧菌分成54种型别,其中优势血清型O3:K6菌株被分成34种带型,揭示北京地区来自于散发腹泻病例的副溶血弧菌,遗传学上高度分化,具有多克隆来源。在对2010年北京市副溶血弧菌PFGE分子分型结果比对分析中,发现3株PFGE电泳带型相同,并且发病日期间隔不到3d,经回顾性调查,病例有共同就餐史,推测可能由于共同暴露导致感染来自同一克隆的副溶血弧菌。由于本研究未取得水产品等食物样本,无法进行溯源性分

析,后续研究和监测应增加食品和外环境分离株的分子分型,将来自临床病例的菌株型别与环境中的菌株型别比对,分析菌株之间的相关性,找出引起副溶血弧菌腹泻的危险因素和可疑食品,从源头控制传染来源,从而更好地做到对食源性疾病的溯源和预警。

[感谢北京市大兴、丰台、顺义、昌平、西城、西城区(宣武)等区(县)疾病预防控制中心相关人员对本研究给予的支持和帮助]

参 考 文 献

- [1] Boyd EF, Cohen ALV, Naughton LM, et al. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. BMC Microbiol, 2008, 8: 110-123.
- [2] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins. Rev Med Microbiol, 1993, 4: 106-113.
- [3] Niehibuehi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infect Immun, 1995, 63(6): 2093-2099.
- [4] Huang F, Deng Y, Qu M, et al. Etiological surveillance analysis of infectious diarrhea caused by pathogenic bacteria during Beijing in 2010. Chin J Prev Med, 2011, 45(9): 820-824. (in Chinese)
黄芳, 邓瑛, 曲梅, 等. 2010年北京市感染性腹泻病原学监测分析. 中华预防医学杂志, 2011, 45(9): 820-824.
- [5] Wang Y, Hu QH, Mu J, et al. Etiologic and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from diarrhea patients in Shenzhen in 2007-2008. Chin J Epidemiol, 2010, 31(1): 51-55. (in Chinese)
王艺, 扈庆华, 牟瑾, 等. 深圳市2007-2008年腹泻病副溶血弧菌监测及分子特性分析. 中华流行病学杂志, 2010, 31(1): 51-55.
- [6] Yeung PS, Hayes MC, DePaola A, et al. Comparative phenotypic, molecular, and virulence characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 isolates. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(6): 2901-2909.
- [7] Cheng SY, Li NM, Zhang YJ, et al. Biologic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from different source. Chin J Food Hyg, 2006, 18(2): 112-114. (in Chinese)
程苏云, 李恩民, 张俊彦, 等. 不同来源的副溶血弧菌生物学特性研究. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 112-114.

(收稿日期:2011-05-24)

(本文编辑:万玉立)

北京市副溶血弧菌病原学和分子流行病学特征分析

作者: [曲梅](#), [张新](#), [刘桂荣](#), [黄瑛](#), [李洁](#), [李锡太](#), [刘元](#), [严寒秋](#), [刘白微](#), [黎新宇](#), [王全意](#),
[黄芳](#), [QU Mei](#), [ZHANG Xin](#), [LIU Gui-rong](#), [HUANG Ying](#), [LI Jie](#), [LI Xi-tai](#), [LIU Yuan](#),
[YAN Han-qi](#), [LIU Bai-wei](#), [LI Xin-yu](#), [WANG Quan-yi](#), [HUANG Fang](#)

作者单位: [100013,北京市疾病预防控制中心传染病地方病控制所](#)

刊名: [中华流行病学杂志](#) 

英文刊名: [Chinese Journal of Epidemiology](#)

年, 卷(期): 2011, 32(12)

被引用次数: 1次

参考文献 (7条)

1. [Boyd EF;Cohenl ALV;Naughton LM](#) [Molecular analysis of the emergence of pandemic Vibrio parahaemolyticus](#)[外文期刊] 2008
2. [Honda T;Iida T](#) [The pathogenicity of Vibrio parahaemolyticus and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysins](#) 1993
3. [Niehibuehi M;Kaper JB](#) [Thermostable direct hemolysin gene of Vibrio parahaemolyticus:a virulence gene acquired by a marine bacterium](#) 1995(06)
4. [黄芳;邓瑛;曲梅](#) 2010年北京市感染性腹泻病原学监测分析[期刊论文]-[中华预防医学杂志](#) 2011(09)
5. [王艺;扈庆华;牟瑾](#) 深圳市2007-2008年腹泻病副溶血弧菌监测及分子特性分析[期刊论文]-[中华流行病学杂志](#) 2010(01)
6. [Yeung PS;Hayes MC;DePaola A](#) [Comparative phenotypic,molecular,and virulence characterization of Vibrio parahaemolyticus O3:K6 isolates](#)[外文期刊] 2002(06)
7. [程苏云;李恩民;张俊彦](#) 不同来源的副溶血弧菌生物学特性研究[期刊论文]-[中国食品卫生杂志](#) 2006(02)

引证文献 (1条)

1. [陶勇](#). [刁保卫](#). [王利](#). [陈谨](#). [程险峰](#). [王艳](#). [汪永禄](#). [朱明](#). [逢波](#) [马鞍山市不同来源副溶血弧菌生物学特征及分子流行病学研究](#)[期刊论文]-[公共卫生与预防医学](#) 2013(3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhlyxbx201112017.aspx