

广东省食源性副溶血弧菌表型特征与分型比较研究

何冬梅 朱海明 马聪 柯碧霞 方伟 谭海玲 李柏生 邓小玲 柯昌文

【摘要】 目的 了解广东省食源性副溶血弧菌的表型特征,并对其分型进行综合比较。方法 对分离自广东省水产品和食物中毒的 74 株副溶血弧菌分离株进行生化鉴定、药敏试验、耐热直接溶血素(*tdh*)和耐热直接溶血素相关溶血素(*trh*)毒力基因的 PCR 检测。并对副溶血弧菌进行血清分型、核糖体基因分型(Ribotyping)和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型,应用 BioNumerics 软件对不同来源、时间和地点的分离株进行比对,分析菌株之间的相关性。结果 副溶血弧菌除对氯霉素 100.00%敏感外,对其余 13 种抗生素均有不同程度的耐药。*tdh* 阳性率为 24.32%、*trh* 阳性率为 4.05%。74 株副溶血弧菌分为 26 种血清型,O5:K17 和 O2:K28 型为水产品分离株的优势血清型,O3:K6 型为食物中毒分离株的优势血清型。74 株副溶血弧菌分为 62 个核糖体型、67 个 PFGE 型,表现出较大的遗传多样性。结论 广东省大部分食物中毒副溶血弧菌分离株携带 *tdh* 毒力基因。3 种分型方法中,PFGE 的分辨率最高,Ribotyping 居中,血清分型最低,3 种方法相结合可提高分辨率。

【关键词】 副溶血弧菌;核糖体分型;脉冲场凝胶电泳

Comparative study on the phenotypic characteristics and molecular typing of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Guangdong province HE Dong-mei¹, ZHU Hai-ming¹, MA Cong¹, KE Bi-xia¹, FANG Wei², TAN Hai-ling¹, LI Bai-sheng¹, DENG Xiao-ling¹, KE Chang-wen¹. 1 Institute of Pathogenic Microorganisms, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China; 2 Department of Clinical Laboratory, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences

Corresponding author: HE Dong-mei, Email: gzhdm@21cn.com

This work was supported by a grant from the Foundation of Medical Science and Technology Research of Guangdong Province (No. A2010061).

【Abstract】 **Objective** To understand the phenotypic characteristics of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* in Guangdong province through carrying out a comprehensive comparison including pulse field gel electrophoresis, ribotyping and serotyping. **Methods** 74 different *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seafood and cases due to food poisoning in Guangdong province were under serotyping and susceptibility testing, in addition to the testing of direct heat hemolysin (*tdh*) and the heat hemolysin-related hemolysin hormone (*trh*) via PCR. Ribosomal genotyping (ribotyping) with *EcoR* I restriction enzyme was utilized on 74 different *Vibrio parahaemolyticus* isolates, whereas pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with the *Not* I restriction enzyme was used on 74 different *Vibrio parahaemolyticus* isolates. BioNumerics software was used to compare the isolates from different sources, times and places in order to elicit the correlation between different strains. **Results** Although *Vibrio parahaemolyticus* was 100.00% sensitive to chloramphenicol, it still presented different levels of resistance against 13 other antibiotics. Among the 74 different strains of *Vibrio parahaemolyticus* under testing, 24.32% showed positive for the *tdh* virulence gene, whereas 4.05% positive for *trh*. 74 different *Vibrio parahaemolyticus* strains were found to belong to 26 serotypes, where the O5:K17 and O2:K28 serotypes were dominant in those isolates that causing seafood-poisoning. The O3:K6 serotype was found to be the dominant of those isolates that causing food-poisoning. Based on ribosomal genotyping, the 74 *Vibrio parahaemolyticus* isolates

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.12.018

基金项目:广东省医学科学技术研究基金(A2010061)

作者单位:510300 广州,广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所(何冬梅、朱海明、马聪、柯碧霞、谭海玲、李柏生、邓小玲、柯昌文);广东省人民医院广东省医学科学院检验科(方伟)

通信作者:何冬梅, Email: gzhdm@21cn.com

were divided into 62 different ribotypes, whereas the 74 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were divided into 67 different PFGE types, thus exhibiting considerable genetic diversities of the strains.

Conclusion Majority of the isolates causing food-poisoning carried *tdh* virulence gene. PFGE was shown to have the highest resolution, followed by ribotyping with serotyping being the lowest, where the combination of the three could improve the resolution.

【Key words】 *Vibrio parahaemolyticus*; Ribotyping; Pulsed-field gel electrophoresis

目前,由副溶血弧菌引起的中毒事件已超过沙门菌,成为我国首要的食源性致病菌^[1]。为了解广东省副溶血弧菌 DNA 特征,建立相应数据库,探索该菌的鉴定及溯源方法,本研究运用生化鉴定、药敏试验、毒力基因检测、血清分型、核糖体分型(Ribotyping)和脉冲场凝胶电泳(PFGE)等方法对副溶血弧菌进行综合性分型鉴定研究。

材料与方法

1. 菌株来源:74 株副溶血弧菌中 50 株源于食品,分离自 2003—2004 年广东省食源性致病菌监测网采样点,另外 24 株分离自 2004—2006 年食物中毒患者肛拭子。

2. 主要仪器、试剂和耗材:VITEK32 全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司);药敏纸片分配器(英国 Oxoid 公司);PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);RiboPrinter 全自动微生物指纹鉴定系统(美国 Dupont 公司);CHEF MAPPER 脉冲场电泳仪和 Gel Doc EQ 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Dade Microscan 浊度仪(美国 DADE BEHRING 公司)。副溶血弧菌检测培养基购自北京陆桥有限责任公司;科玛嘉弧菌显色培养基购自法国科玛嘉公司;VITEK32 NFC 生化卡购自法国生物梅里埃公司。副溶血弧菌鉴定血清购自日本生研株式会社。Oxoid 抗生素纸片购自广州市乐通泰生物科技有限公司;质控标准菌株大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 由广东省疾病预防控制中心菌种库提供。毒力基因引物由上海生物工程有限公司合成;PCR 试剂购自大连宝生物公司。RiboPrinter 全自动微生物指纹鉴定系统配套试剂和耗材购自美国 Dupont 公司;脑心浸液琼脂购自 Oxoid 公司。*Xba* I、*Not* I 酶购自美国 Promega 公司;SeaKem Gold 琼脂糖购自美国 Cambrex 公司。

3. 方法:

(1)副溶血弧菌的检测:参照《食源性致病菌监测网技术手册》进行分离鉴定,经 VITEK32 全自动微生物分析仪进行。

(2)药敏试验:参照《全国临床检验操作规程》和美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)推荐的纸片

扩散法进行检测,结果判断参照 NCCLS 药敏标准。

(3)毒力基因 *tdh* 和 *trh* 检测:引物见表 1(参考文献[2])。采用水煮法粗提 DNA,PCR 反应体系:12.5 μl Premix Taq (Taq 0.05 U/μl, dNTP Mixture 各 250 μmol/L, 1 × PCR Buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂),引物各 0.5 μl,模板约 50 ng,灭菌水 9.5 μl。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s,35 个循环;72 °C 延伸 4 min。取 3 μl PCR 产物进行凝胶电泳。

表 1 副溶血弧菌毒力基因引物

目的基因	引物名称	引物序列(5' ~ 3')	产物大小(bp)
<i>tdh</i>	TDH-1	AGC TTC CAT CTG TCC CTT TT	434
	TDH-2	ATT ACC ACT ACC ACT CTC ATA	
<i>trh</i>	R2	GGC TCAAAA TGG TTA AGC G	250
	R6	CAT TTC CGC TCT CAT ATG C	

(4)血清学分型:按试剂盒说明书分别进行 O、K 抗原凝集试验。

(5)Ribotyping:利用 RiboPrinter 全自动微生物指纹鉴定系统和配套试剂进行。将副溶血弧菌接种至含 3%NaCl 的脑心浸液琼脂,37 °C 培养过夜。取 200 μl 样品缓冲液加入 1.5 ml 离心管中,取菌搅拌均匀后,吸取 30 μl 菌悬液于加热器中加热灭活并冷却,然后加入裂解液 A 和 B 各 5 μl,上样,电泳 8 h。

(6)PFGE 分型:参照美国 PulseNet PFGE 分型标准方法。将副溶血弧菌接种在 TSA-SB 琼脂,37 °C 培养过夜。挑取适量细菌放入含 2 ml CSB 的 Falcon2054 管中,调整浊度至 0.45 ~ 0.50;取 400 μl 菌悬液加入 20 μl 蛋白酶 K (20 mg/ml)上下吹打混匀,37 °C 孵育 5 min;然后加入 400 μl 的 1%SeaKem Gold 琼脂糖混匀后立即灌注模具,待其凝固,上样,置 54 °C 水浴摇床孵育至少 2 h。弃溶液,用灭菌纯水洗胶块 2 次,再用 TE 洗胶块 4 次,每次摇 15 min (54 °C)。切取 2 mm 胶条加入 Buffer D 的稀释液中,37 °C 水浴 15 min。然后将胶条转入 *Not* I 酶切反应体系中进行酶切(Marker 用 *Xba* I 进行酶切),37 °C 水浴 4 h。将上述胶条置于梳齿上,缓慢倒入 1%SeaKem Gold 琼脂糖。凝固后放已加入 0.5 × TBE 缓冲液的电泳槽中,在温度 14 °C、脉冲时间 10 ~ 35.03 s 条件下,电泳 19 h。EB 染色 30 min,脱

色90 min,最后用Gel Doc EQ拍摄图像。

(7) 图像处理和聚类分析:采用BioNumerics V4.0软件处理图像,聚类分析选择组间非加权的几何平均数(UPGMA)方法,采用基于曲线比较的Pearson系数衡量核糖体DNA(rDNA)图谱的相似程度;采用基于条带比较的Dice系数衡量PFGE带型之间的相似程度。

结 果

1. 药敏反应:74株副溶血弧菌除对氯霉素100%敏感外,对其余13种抗菌药物均有不同程度的耐药,对链霉素的耐药率达到93.24%,氨苄西林的耐药率为79.73%,阿米卡星的耐药率为67.57%(表2)。

表2 广东省74株副溶血弧菌药物敏感性(%)

药物名称	药物含量(μg)	耐药	中度敏感	敏感
复方新诺明	25	1.35	1.35	97.30
萘啶酮酸	30	4.05	1.35	94.59
磺胺嘧啶	300	9.46	16.22	74.32
头孢噻吩	30	36.49	40.54	22.97
阿莫西林	25	62.16	21.62	16.22
氨苄西林	10	79.73	5.41	14.86
链霉素	10	93.24	1.35	5.41
阿米卡星	30	67.57	9.46	22.97
庆大霉素	10	54.05	18.92	27.03
甲氧苄啶	5	6.76	32.43	60.81
环丙沙星	5	1.35	12.16	86.49
四环素	30	2.70	0.00	97.30
头孢曲松	30	0.00	2.70	97.30
氯霉素	30	0.00	0.00	100.00

2. 毒力基因 tdh 和 trh 检测: tdh 阳性率为24.32%(18/74), trh 阳性率为4.05%(3/74)。其中分离自食物中毒病例的菌株 tdh 阳性率为75.00%(18/24), trh 阳性率为12.5%(3/24)。分离自水产品的菌株 tdh 和 trh 均为阴性。

3. 分型:

(1) 血清学分型:74株副溶血弧菌分为26种血清型,完全分型41株,分型率为55.41%(41/74)。水产品分离株共分为22种血清型,为O1、O2、O3、O4、O5、O10和O11群,其中O5:K17占14.0%(7/50),O2:K28占8.0%(4/50),为水产品分离株的优势血清型。食物中毒分离株分为9种血清型,为O1、O2、O3、O4、O5和O10群,其中O3:K6占50.0%(12/24),为食物中毒分离株的优势血清型,但在水产品分离株中未见该血清型。此外,在水产品分离株中检出7株抗原表中未出现的新血清型,分别是O1:K30、O2:K II、O2:K IV、O4:K29、O4:K56、O4:K II和O11:K31。

(2) Ribotyping:采用 $EcoR$ I酶,通过RiboPrinter系统对副溶血弧菌进行Ribotyping,得到1.1~48 kb的rDNA指纹图谱。对rDNA图谱进行聚类分析,根据电泳产生条带的位置和相关条带的强度不同,将74株副溶血弧菌分为62个核糖体型,相似值在41.4%~99.9%(图1),表现出较大的遗传多样性。其中,菌株03V118a和03V118b、04VGD089a和04V89、03V414b和03V414是分离自同一份样品的不同菌株,核糖体型各不相同。

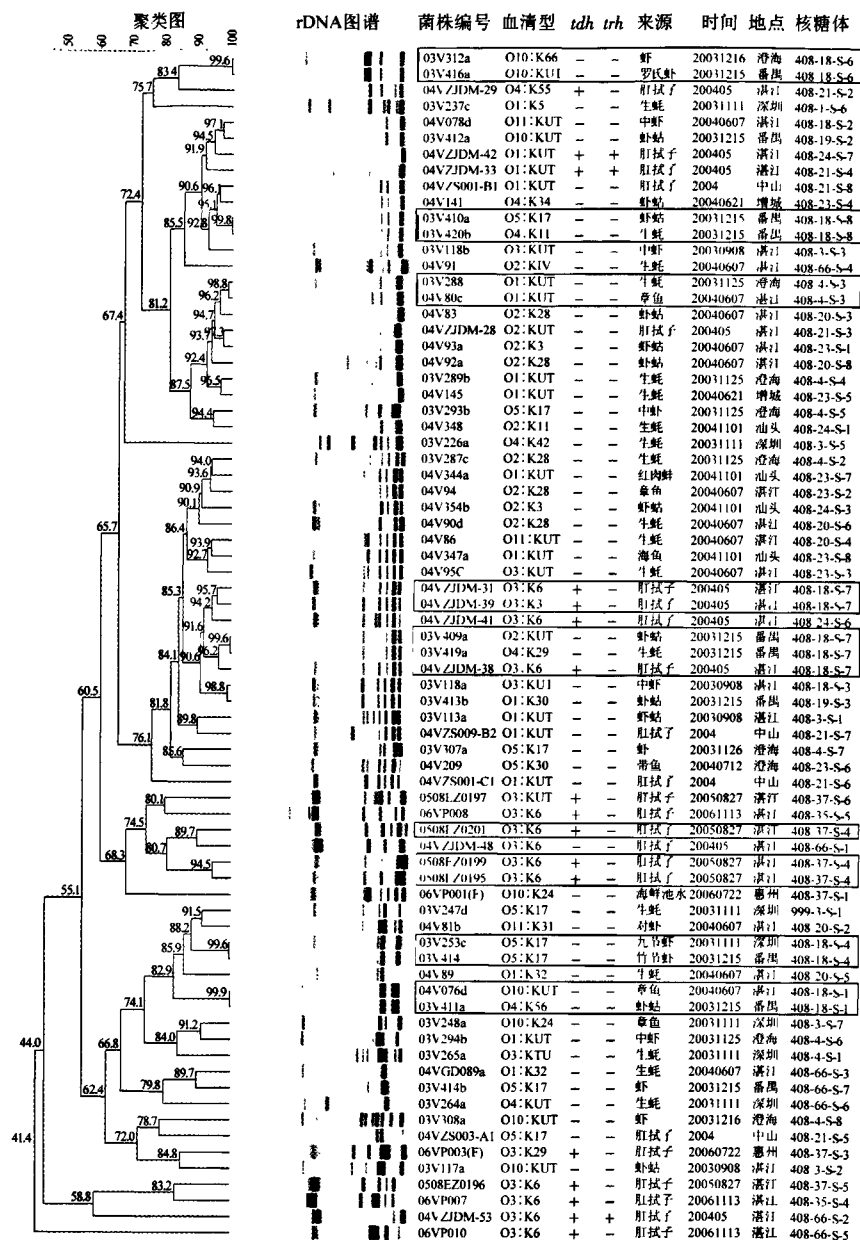
(3) PFGE:应用PFGE分型技术对副溶血弧菌进行电泳,采用 Not I酶切,可产生11~19条DNA片段,分子量在20~700 kb之间。对PFGE图谱进行聚类分析,根据电泳产生条带的位置和数量的不同,74株副溶血弧菌分为67个PFGE型,相似值在57.4%~100.0%(相似度为100.0%者视为同一PFGE型),聚类分析结果见图2。其中,菌株03V118a和03V118b、04VGD089a和04V89是分离自同一份样品的不同菌株,具有相同的PFGE图谱。菌株03V414和03V414b分离自同一份样品的不同菌株,但PFGE图谱不同。

4. 食物中毒分离株聚类分析:

(1) 2004年湛江食物中毒事件中菌株04VZJDM-31和04VZJDM-38血清型为O3:K6,04VZJDM-39血清型为O3:K3,这3株菌血清型不同核糖体型相同,均为E408-18-S-7(图1);菌株04VZJDM-31、04VZJDM-38、04VZJDM-41、04VZJDM-48和04VZJDM-53血清型为O3:K6,为PFGE 2型,相似值为100.0%(图2),而菌株04VZJDM-39血清型为O3:K3,04VZJDM-29血清型为O4:K55,04VZJDM-28血清型为O2:KUT,04VZJDM-33和04VZJDM-42为O1:KUT,同一起食物中毒事件,10份患者肛拭子出现5种血清型、6种PFGE型、8种核糖体型,属混合感染。

(2) 2005年湛江食物中毒事件中菌株0508EZ0197血清型为O3:KUT,0508EZ0196、0508EZ0201、0508EZ0199和0508EZ0195血清型为O3:K6;后3株菌核糖体型相同,为E408-37-S-4(图1)。0508EZ0196和0508EZ0199为PFGE 1型,这5株菌PFGE图谱相差1~2条DNA片段,相似值为90.2%~100.0%(图2)。

(3) 2006年湛江食物中毒事件中菌株06VP007、06VP008和06VP010血清型均为O3:K6,3株菌核糖体各不相同(图1),06VP007的PFGE图谱比06VP008的图谱多1条DNA片段,相似值为95.5%;



注:方框内为核糖体一致的一些菌株

图1 广东省74株副溶血弧菌 Ribotyping 分型结果(EcoRI 酶)

而06VP010与这2株菌的相似值为90.2%,相差3~4条DNA片段(图2)。

讨论

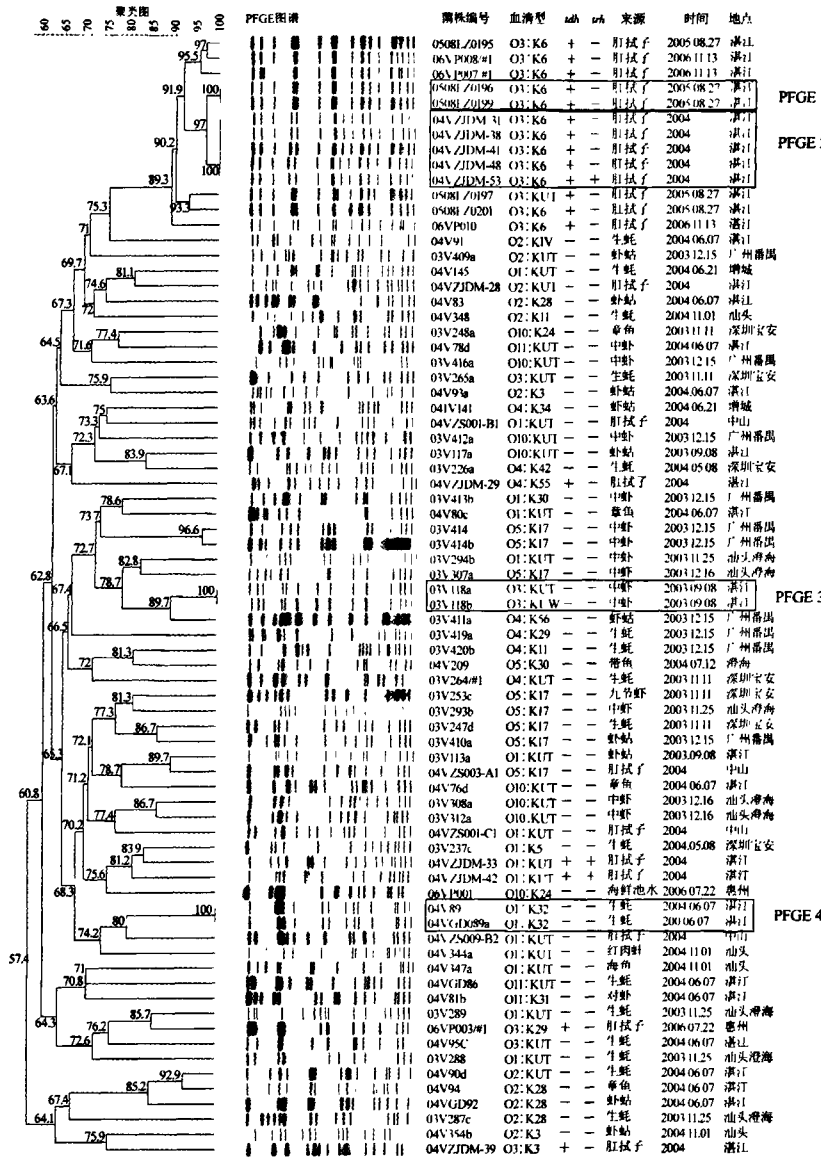
本研究结合血清分型、Ribotyping 和 PFGE 对副溶血弧菌进行研究,发现血清分型能力最低,分型率只有 55.41%,而 Ribotyping 和 PFGE 对所有副溶血弧菌均能分型,分型率达到 100%。菌株 03V414 和 03V414b 来源相同,血清型相同,核糖体型和 PFGE 型均不同;菌株 03V118a 和 03V118b、04V89 和 04VGD089a 来源相同,血清型和 PFGE 型相同,核糖体型不同;菌株 03V312a 和 03V416a 核糖体型相同,

血清型和 PFGE 型均不同;菌株 03V253c 和 03V414 血清型和核糖体型均相同,PFGE 型不同;提示血清分型、Ribotyping 和 PFGE3 种方法相结合可增加分辨率。菌株 04V076d 和 03V411a 核糖体型相同,血清型和 PFGE 型不同;菌株 04V80c 和 03V288 血清型和核糖体型相同,PFGE 型不同,提示 PFGE 分辨率高于 Ribotyping 和血清分型。

菌株 04VZJDM-31、04VZJDM-39 和 04VZJDM-38 分离自湛江食物中毒患者肛拭子,菌株 03V409a 和 03V419a 分离自番禺的虾和生蚝,具有相同的核糖体型 E408-18-S-7,为优势核糖体型,提示此核糖型的存在可能引起感染,应引起监测部门注意。

菌株 03V312a 和 03V416a、03V253c 和 03V414 分离自不同地区的虾,各具有相同的核糖体型 E408-18-S-6 和 E408-18-S-4,提示水产品种类相同可有相同的核糖体型。菌株 03V410a 和 03V420b、03V409a 和 03V419a 分离自虾和生蚝;03V288 和 04V80c 分离自生蚝和章鱼;04V076d 和 03V411a 分离自章鱼和虾;分别具有相同的核糖体型 E408-18-S-8、E408-18-S-7、E408-4-S-3、E408-18-S-1,提示水产品种类不同也可存在相同的核糖体型。由于水产品种类不论相同与否,均可存在相同的核糖体型,因此, Ribotyping 与水产品种类不相关。

虽然没有地区各自的优势核糖体型,但不同地区的菌株却有相同的核糖体型,菌株 04V80c 分离自湛江的章鱼,03V288 分离自澄海的生蚝,菌株分离时间相隔 1 年,具有相同的核糖体型 E408-4-S-3。菌株 04V076d 分离自湛江的章鱼,03V411a 分离自番禺的虾,菌株分离时间相隔 1 年,也具有相同的核糖体型 E408-18-S-1,提示不同地区的食品有可能通过交通运输等方式发生跨地区交叉污染的现象;尽管时间变迁,菌株不断传代,没有发生变异,仍然为同一克隆。



注:方框内为 PFGE 相同的菌株
图 2 广东省 74 株副溶血弧菌 PFGE 分型结果(Not I 酶)

在水产品污染物监测中发现同一份样品分离到的不同菌株 03V414 和 03V414b 有不同的 rDNA 图谱和 PFGE 图谱,推测水生动物生活在海洋里,海水环境中可存在着不同克隆的副溶血弧菌,通过富集作用,同一水生动物可同时污染多个克隆的副溶血弧菌,提示同一份样品可污染不同克隆的副溶血弧菌,与李薇薇等^[3]报道结果一致。对副溶血弧菌食物中毒事件溯源时,也表现出多种血清型、多种克隆株的混合感染,推测患者在食入污染多种克隆弧菌的水产品后也各自感染不同克隆的弧菌,因而表现出多种血清型、多种克隆株的混合感染。因此在追踪原因食品时,只有对同一食品的多个分离株和患者的多个分离株进行亲缘关系比对,才能找到真正

的致病原因。
虽然通过对 rDNA 图谱和 PFGE 图谱进行分子流行病学分析,两者均可以推断出菌株间的亲缘关系。但在解释食物中毒事件时, Ribotyping 是将相似值为 93% 以上作为食源性疾病暴发的溯源依据^[4],而 PFGE 采用 Tenover 等^[5]推荐的分析体系,用于确定菌株间的相关性,如各实验菌的 PFGE 产生相同的条带数且相应条带大小相同,在流行病学上则认为传染源为同一克隆;若分离株有 1~3 个电泳条带的差异,则说明其基因组上有一个遗传性状的改变,认为其紧密相关;若分离株有 4~6 个电泳条带的差异,则说明其基因组上有 2 个独立遗传性状的改变,认为其可能相关;若分离株有 6 个以上电泳条带的差异,则说明它们之间有 3 个或更多遗传性状的改变,可以认为不具相关性。由于 2005 年食物中毒 5 株菌的 PFGE 图谱相差 1~2 条 DNA 片段,故认为该 5 株菌紧密相关。2006 年食物中毒 3 株菌的 PFGE 图谱相差 3~4 条 DNA 片段,故认为其可能相关。PFGE 比 Ribotyping 结果更易于解释。

(感谢解放军第 458 医院王洪敏博士的帮助)

参 考 文 献

[1] Liu XM, Chen Y, Wang XY, et al. Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001 national foodborne disease surveillance system. J Hyg Res, 2004, 33(6): 725-727. (in Chinese)
刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992-2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病预防网. 卫生研究, 2004, 33(6): 725-727.
[2] Cheng SY, Weng JQ, Lin XJ, et al. Detection of serotype, drug resistance and gene of *Vibrio parahaemolyticus* causing foodborne disease. Chin J Health Inspection, 2002, 12(2): 141-142. (in Chinese)
程亦云,翁景清,林香娟,等. 副溶血性弧菌食物中毒菌株的血清型、耐药性及基因检测. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 141-142.
[3] Li WW, Wang XY, Pei XY, et al. Homology analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated by MPN method using pulsed-field gel electrophoresis and automated ribotyping. J Hyg Res, 2010, 39(3): 374-380. (in Chinese)
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. 卫生研究, 2010, 39(3): 374-380.
[4] Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice. Washington, DC: ASM Press, 2004.
[5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.

(收稿日期:2011-06-09)
(本文编辑:万玉立)

广东省食源性副溶血弧菌表型特征与分型比较研究

作者: [何冬梅](#), [朱海明](#), [马聪](#), [柯碧霞](#), [方伟](#), [谭海玲](#), [李柏生](#), [邓小玲](#), [柯昌文](#), [HE Dong-mei](#), [ZHU Hai-ming](#), [MA Cong](#), [KE Bi-xia](#), [FANG Wei](#), [TAN Hai-ling](#), [LI Bai-sheng](#), [DENG Xiao-ling](#), [KE Chang-wen](#)

作者单位: [何冬梅,朱海明,马聪,柯碧霞,谭海玲,李柏生,邓小玲,柯昌文,HE Dong-mei,ZHU Hai-ming,MA Cong,KE Bi-xia,TAN Hai-ling,LI Bai-sheng,DENG Xiao-ling,KE Chang-wen\(广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所,广州,510300\)](#), [方伟,FANG Wei\(广东省人民医院广东省医学科学院检验科\)](#)

刊名: [中华流行病学杂志](#) 

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

年, 卷(期): 2011, 32(12)

参考文献(5条)

1. [刘秀梅;陈艳;王晓英](#) 1992-2001年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网[期刊论文]-[卫生研究](#) 2004(06)
2. [程苏云;翁景清;林香娟](#) 副溶血性弧菌食物中毒菌株的血清型、耐药性及基因检测[期刊论文]-[中国卫生检验杂志](#) 2002(02)
3. [李薇薇;王晓英;裴晓燕](#) 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[期刊论文]-[卫生研究](#) 2010(03)
4. [Persing DH;Tenover FC;Versalovic J](#) [Molecular Microbiology:Diagnostic Principles and Practice](#) 2004
5. [Tenover FC;Arbeit RD;Goering RV](#) [Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis:criteria for bacterial strain typing](#) 1995(09)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhllxbx201112018.aspx