

# 广东省2013年副溶血弧菌暴发与散发菌株的病原学特征

效拟 李柏生 刘谢 肖媛 黄嘉盈 柯碧霞 谭海玲 柯昌文 俞守义

**【摘要】目的** 了解2013年广东省副溶血弧菌暴发与散发分离株的血清型别、抗菌药物耐药性、毒力基因携带情况以及分子分型特征。**方法** 对36株暴发分离株和43株散发分离株进行血清分型、药敏试验以及耐热直接溶血毒素基因(*tdh*)、耐热相关溶血毒素基因(*trh*)、*GS-PCR*和*orf8*基因的PCR检测,并进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型。**结果** 36株暴发分离株全部为O3:K6血清型,43株散发分离株的优势血清型为O3:K6型(23株,53.49%)。药敏检测结果显示,对氨苄西林(96.20%)和头孢噻吩(40.50%)的耐药率较高;对复方新诺明和氯霉素则高度敏感,敏感性均为100%。多重耐药分析显示,83.33%(30/36)的暴发分离株同时耐受≥3种抗菌药,37.21%(16/43)的散发分离株同时耐受≥3种抗菌药物。毒力基因PCR检测显示,36株暴发分离株均为*tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>-</sup>型菌株。86.05%(37/43)的散发分离株为*tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>-</sup>型菌株,11.63%(5/43)为*tdh*<sup>-</sup>*trh*<sup>+</sup>型菌株,仅1株为*tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>+</sup>型菌株。暴发分离株全部携带*GS-PCR*和/或*orf8*基因,51.16%(22/43)的散发分离株携带*GS-PCR*和/或*orf8*基因。PFGE显示,79株副溶血弧菌经*Not I*酶切后的PFGE图谱可分为3个聚类,32种PFGE型别,相似值为59.8%~100.0%。暴发菌株聚集在同一个聚类中,散发菌株散布在各个聚类中。**结论** 2013年广东省副溶血弧菌优势血清型为O3:K6型,菌株对多数抗菌药物仍然比较敏感,但存在多重耐药现象,多数菌株携带*tdh*基因,大部分O3:K6型菌株携带*GS-PCR*和/或*orf8*基因;PFGE结果提示广东省副溶血弧菌存在遗传多样性。

**【关键词】** 副溶血弧菌;大流行克隆株;脉冲场凝胶电泳;病原学

**Etiologic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains causing outbreaks and sporadic cases in Guangdong, 2013** Xiao Ni<sup>1</sup>, Li Baisheng<sup>2</sup>, Liu Xie<sup>1</sup>, Xiao Yuan<sup>1</sup>, Huang Jiaying<sup>3</sup>, Ke Bixia<sup>2</sup>, Tan Hailing<sup>2</sup>, Ke Changwen<sup>2</sup>, Yu Shouyi<sup>1</sup>. 1 Department of Epidemiology, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2 Institute of Pathogenic Microbiology Bacteriology Laboratory, Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention; 3 Center for Disease Control and Prevention of Liwan District of Guangzhou

Corresponding author: Yu Shouyi, Email: qingchen@fimmu.com

This work was supported by a grant from the Foundation of Medical Science and Technology Research of Guangdong Province (No. A2014090).

**【Abstract】Objective** To study the serotypes, antimicrobial resistance, virulence genes and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from outbreaks and sporadic cases in Guangdong, 2013. **Methods** 36 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from outbreaks and 43 strains from sporadic cases were sero-typed and tested for antimicrobial resistance. PCR was used to detect for *tdh* (thermostable direct hemolysin gene), *trh* (*tdh*<sup>-</sup> related hemolysin gene), *GS-PCR* and *orf8* genes. All the samples were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** 36 isolates from outbreaks were all identified as O3:K6, and among the 43 sporadic isolates, O3:K6 (23, 53.49%) was the dominant serotype. *Vibrio parahaemolyticus* isolates showed high resistance rate to ampicillin (96.20%) and cefalotin (40.50%), but were high sensitive to cotrimoxazole (100%) and chloramphenicol (100%). 83.33% (30/36) outbreak isolates were resistant to multi-drugs but only 37.21% (16/43) of the sporadic isolates showed so. Results from virulence gene detection suggested that all the 36 outbreak isolates belonged to *tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>-</sup> strains, while 86.05% (37/43) of the sporadic

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.12.014

基金项目:广东省医学科学研究基金(A2014090)

作者单位:510515 广州,南方医科大学公共卫生与热带医学学院流行病学教研室(效拟、刘谢、肖媛、俞守义);广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所(李柏生、柯碧霞、谭海玲、柯昌文);广州市荔湾区疾病预防控制中心(黄嘉盈)

通信作者:俞守义, Email: qingchen@fimmu.com

isolates were *tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>-</sup> and 11.63% (5/43) were *tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>+</sup>. Only one *tdh*<sup>+</sup>*trh*<sup>+</sup> strain was found. All the outbreak isolates contained *GS-PCR* and/or *orf8* genes, whereas among the sporadic isolates only 51.16% (22/43) of them carrying the similar genes. Results from PFGE analysis suggested that 79 isolates were discriminated into 3 clusters and 32 different PFGE patterns with the similarity value between 59.8% and 100.0%. Outbreak isolates seemed to gather in the same cluster, while the sporadic isolates spreading in all the three clusters. **Conclusion** O3 : K6 was the dominant serotype in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Guangdong, 2013. These strains showed high sensitivity to most antibiotics, but with multi-drug resistance. Positive rate of *tdh* gene was high, and most O3 : K6 strains contained *GS-PCR* and/or *orf8* genes. PFGE analysis revealed genetic diversity was within the *Vibrio parahaemolyticus* strains in Guangdong.

**【Key words】** *Vibrio parahaemolyticus*; Pandemic clone; Pulsed field gel electrophoresis; Etiology

副溶血弧菌(VP)作为我国食源性疾病暴发的首要病原菌,在广东地区引发的食物中毒事件无论是在发生次数和规模上均呈明显上升趋势<sup>[1,2]</sup>。为了解2013年广东地区副溶血弧菌的暴发分离株与散发分离株的病原学特征及其相关性,本研究拟对79株VP进行血清分型、药敏试验、毒力基因检测,并结合脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术进行分子特征研究。

### 材料与方法

1. 菌株来源:散发菌株来源于2013年广东省食源性疾病监测中各哨点医院采集腹泻患者粪便标本。暴发菌株分离自广州和珠海地区的2起副溶血弧菌引起的食物中毒事件,总计53株,从中挑选36株具有代表性的菌株进行研究。

#### 2. 研究方法:

(1)仪器与试剂:药敏纸片分配器(英国Oxoid公司);PCR仪(德国Eppendorf公司);CHEE MAPPER脉冲场凝胶电泳仪和Gel Doc EQ凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);比浊仪(美国DADE BEHRING公司)。诊断血清(日本Denka Seiken公司);Oxide抗生素纸片(广州市乐通泰生物科技有限公司);PCR试剂[宝生物工程(大连)有限公司],PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成;*Not I*酶和*Xba I*酶(美国Promega公司),SeaKem Gold琼脂糖(美国Cambrex公司),蛋白酶K(Merck公司)。所有试剂均在有效期内使用。

(2)血清学分型:用3%NaCl TSA培养物上的菌苔进行玻片凝集检测K抗原。取新鲜培养物至3%NaCl灭菌盐水试管中研磨制成均匀浓厚的菌悬液,经121℃灭菌1h,4 000 r/min离心10 min,吸弃上清液,再用3%NaCl灭菌盐水重悬,此菌悬液用于检测O抗原。同时用生理盐水作对照。

(3)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协会(CLSI)推荐的纸片扩散法进行检测。

(4)细菌PCR鉴定:用水煮法粗提DNA,经复苏的分离株接种于3%NaCl TSA斜面培养基,37℃培养18~24 h后,挑取1环菌苔于200 μl灭菌水中充分研磨,菌悬液于100℃水浴10 min后冰浴5 min,10 000 r/min离心5 min,上清即为菌株DNA稀释液。使用Premix Ex Taq™[宝生物工程(大连)有限公司]配制25 μl的反应体系检测*tdh*和*trh*、*GS-PCR*和*orf8*片段,引物序列和反应条件见表1。

(5)PFGE:参照美国PulseNet的副溶血弧菌PFGE标准操作方法。胶块内染色体DNA的酶切使用内切酶*Not I*酶切(标准菌株H9812使用*Xba I*酶切),在CHEE MAPPER脉冲场电泳仪(美国Bio-Rad公司)上电泳(温度14℃、起始转换时间为10 s,终止转换时间为35.03 s)18 h。电泳结束后,1%的EB染色30 min,脱色90 min后,使用Gel Doc EQ拍摄图像。获得的图像通过BioNumerics V5.01软件(Applied Maths BVBA)分析图谱,得到菌株带型相似性的聚类分析树图。

表1 副溶血弧菌基因检测引物序列及反应条件

目的基因	引物名称	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)	反应条件
<i>tdh</i>	TDH-1	AGC TTC CAT CTG TCC CTT TT	434	94℃ 3 min; 94℃ 40 s, 60℃ 40 s, 72℃ 40 s, 30个循环; 72℃ 3 min(双重检测)
	TDH-2	ATT ACC ACT ACC ACT CTC ATA		
<i>trh</i>	R2	GGC TCA AAA TGG TTA AGC G	250	
	R6	CAT TTC CGC TCT CAT ATG C		
<i>orf8</i>	orf8-F	GTT CGC ATA CAG TTG AGG	746	94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 5 min <sup>[9]</sup>
	orf8-R	AAG TAC AGC AGG AGT GAG		
<i>GS-PCR(toxRS/new)</i>	GS-VP1	TAA TGA GGT AGA AAC A	651	96℃ 5 min, 96℃ 1 min, 45℃ 2 min, 72℃ 3 min, 25个循环; 72℃ 7 min <sup>[10]</sup>
	GS-VP2	ACG TAA CGG GCC TAC A		

## 结 果

1. 血清学分型:2013年广东省食源性疾病监测网络共分离得到副溶血弧菌43株(散发株)。主要分离自广州(30株)、阳江(4株)等地,通过血清学分型主要为O3:K6型(23株,53.49%),其次为O4:K8型(5株,11.63%)、O1:K56型(5株,11.63%)和O4:KUT型(5株,11.63%),O1:KUT型2株,O3:KUT、O4:K9和O4:K55型各1株。36株暴发株分离自广州(25株)和珠海(11株)的2起食物中毒事件,均分离自病例,经鉴定血清型全部为O3:K6型,未获得可疑的食品分离株(表2)。

表2 2013年广东省监测地区副溶血弧菌分离株血清学分型

菌株来源	地区	菌株数	血清学分型	患者分离株数
散发病例	广州	30	O3:K6	15
			O4:K8	5
			O1:KUT	1
			O1:K56	4
			O3:KUT	1
			O4:KUT	4
			O4:K9	1
	阳江	4	O3:K6	3
			O4:KUT	1
	江门	3	O3:K6	1
			O1:KUT	1
	东莞	2	O3:K6	1
			O4:K55	1
佛山	2	O3:K6	1	
		O4:K55	1	
汕头	1	O1:K56	1	
		O3:K6	1	
暴发病例	广州	25	O3:K6	25
			珠海	11

2. 药敏试验:79株副溶血弧菌分离株对氨苄西林的耐药率最高,达96.2%,其次为头孢噻吩(40.5%),对其他抗生素的耐药率均低于10.0%。对环丙沙星的耐药率为1.3%,中度敏感率为48.1%(表3)。多重耐药分析显示,83.3%(30/36)的暴发分离株对≥3种抗菌药同时耐受,其中6株对≥6种抗菌药物耐药,这些菌株均分离自广州。散发分离株中37.2%(16/43)对≥3种抗菌药物同时耐受(表4)。

3. 毒力基因检测:86.05%(37/43)的散发分离株为 $tdh^+trh^-$ 菌株,11.63%(5/43)为 $tdh^-trh^+$ 菌株,1株为 $tdh^+trh^+$ 菌株。暴发分离株的毒力基因携带情况一致,均为 $tdh^+trh^-$ 菌株。如表5所示,36株暴发分离株均携带GS-PCR和/或orf8基因,散发分离株中51.6%(22/43)携带GS-PCR和/或orf8基因。携带GS-PCR和/或orf8基因的菌株的血清型全部为O3:K6型。10.34%(6/58)的菌株仅携带orf8基因,6.90%

表3 2013年广东省监测地区副溶血弧菌药物敏感性(%)

抗生素名称	耐药	中度敏感	敏感
氨苄西林	96.2	2.5	1.3
头孢噻吩	40.5	46.8	12.7
头孢曲松	5.1	24.1	70.9
亚胺培南	0.0	3.8	96.2
阿米卡星	6.3	31.6	62.0
庆大霉素	2.5	8.9	88.6
萘啶酸	1.3	0.0	98.7
环丙沙星	1.3	48.1	50.6
复方新诺明	0.0	0.0	100.0
氯霉素	0.0	0.0	100.0
四环素	0.0	1.3	98.7

注:抗生素分类参见文献[3]

(4/58)菌株仅携带GS-PCR基因,2种菌株均缺失其中1种标识。

4. PFGE:使用Not I酶对79株副溶血弧菌进行PFGE分型,结果显示菌株间的相似值为59.8%~100.0%,可分为3个聚类(I~III),优势血清型O3:K6主要集中于Cluster II中,Cluster I和III主要为非O3:K6型分离株。3大聚类可再细分为32种不同的PFGE型别。暴发分离株主要聚集在Cluster II上,散发分离株分散在不同的聚类中(图1)。

## 讨 论

2013年广东省流行的副溶血弧菌无论是散发还是暴发均以O3:K6血清型为主,与近年来我国其他地区的腹泻患者分离得到的副溶血弧菌的主要血清型别分布一致<sup>[4]</sup>。而广东地区报道的另外一种优势血清型O4:K8型在2013年仅在散发分离株中检测发现<sup>[5]</sup>,在全部分离株中所占比例仅为6.33%(5/79),比2009年的30%大幅下降,提示2013年O4:K8型副溶血弧菌尚未成为本地区稳定的优势血清型。

副溶血弧菌“大流行克隆株”特指1996年以后分离的 $tdh^+trh^-$ ,GS-PCR阳性(group-specific PCR)和/或orf8<sup>+</sup>的副溶血弧菌<sup>[6]</sup>。近几年,鉴定为大流行克隆株的包括O3:K6,O4:K8等在内的20多种血清型。本研究显示,除了82.76%(48/58)的“大流行克隆株”为GS-PCR<sup>+</sup>orf8<sup>+</sup>外,还有10.34%(6/58)的“大流行克隆株”为GS-PCR<sup>+</sup>orf8<sup>-</sup>,6.90%(4/58)的“大流行克隆株”为GS-PCR<sup>-</sup>orf8<sup>+</sup>,以上2种菌株均缺失了其中1种标识,这种缺失情况不仅在中国也在孟加拉国等地的研究中发现过<sup>[7,8]</sup>。而有研究认为,1株副溶血弧菌同时拥有tdh和toxRS/new基因才能被称为“大流行克隆株”<sup>[9]</sup>,另一方面,orf8基因位于f237噬菌体上,而此噬菌体被认为是1996年后出现的“大流行克隆株”所特有的,是检测“大流行克隆

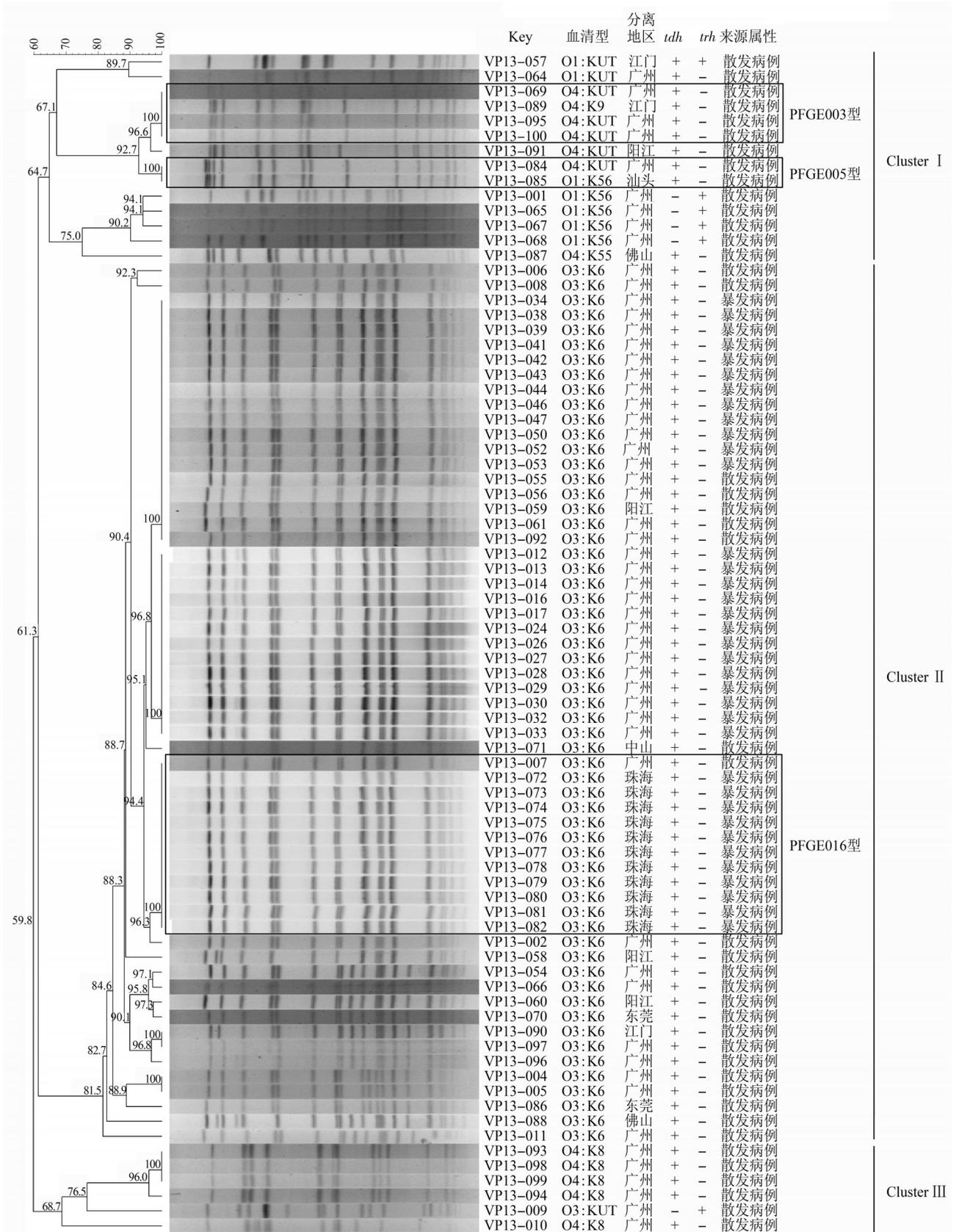


图1 2013年广东省79株副溶血弧菌的PFGE图谱及聚类分析

表 4 2013 年广东省监测地区副溶血弧菌分离株耐药谱

菌株来源	耐 药 谱	菌株数	
散发病例	氨苄西林	8	
	氨苄西林、头孢噻吩	19	
	氨苄西林、头孢噻吩、阿米卡星	2	
	氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星	3	
	氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松	3	
	氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星、阿米卡星	4	
	氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松、环丙沙星	2	
	氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松、环丙沙星、阿米卡星	2	
	暴发病例	氨苄西林	3
		氨苄西林、头孢噻吩	3
氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星		7	
氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松		1	
氨苄西林、头孢噻吩、庆大霉素、阿米卡星		1	
氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星、阿米卡星		4	
氨苄西林、头孢噻吩、环丙沙星、庆大霉素、阿米卡星		2	
氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松、环丙沙星、阿米卡星		9	
氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松、环丙沙星、庆大霉素、阿米卡星		5	
氨苄西林、头孢噻吩、头孢曲松、环丙沙星、萘啶酸、庆大霉素、阿米卡星		1	

表 5 2013 年广东省监测地区副溶血弧菌特征基因携带情况

菌株来源	血清型	菌株数	毒素基因		大流行群标识		
			<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>GS-PCR</i>	<i>orf8</i>	鉴定结果
散发病例	O3 : K6	15	+	-	+	+	PC
		3	+	-	-	+	PC
		4	+	-	+	-	PC
		1	+	-	-	-	NPC
	O4 : K8	5	+	-	-	-	NPC
	O1 : KUT	1	+	-	-	-	NPC
		1	+	+	-	-	NPC
	O1 : K56	1	+	-	-	-	NPC
		4	-	+	-	-	NPC
	O4 : KUT	5	+	-	-	-	NPC
O3 : KUT	1	-	+	-	-	NPC	
O4 : K9	1	+	-	-	-	NPC	
O4 : K55	1	+	-	-	-	NPC	
暴发病例	O3 : K6	33	+	-	+	+	PC
		3	+	-	-	+	PC

注:PC:大流行克隆株; NPC:非大流行克隆株

株”的 1 种有用的遗传标记物<sup>[10]</sup>。但结合本研究结果提示,单独检测 *orf8* 或 *toxRS/new* 基因可能存在漏检,同时检测更有助于鉴别“大流行克隆株”。

PFGE 结果显示,2013 年发生在广州和珠海的 2 起副溶血弧菌引起的食物中毒暴发事件的临床分离株虽均为 O3 : K6 血清型,但 PFGE 型别不一致,提示这 2 个地区引起食物中毒的副溶血弧菌存在差异,但相关性较高。在同一暴发事件的分离株中出现 2 种不同的 PFGE 型别,但相似性极高,结合患者的发病时间、就餐情况、临床表现以及暴露因素等流行病学资料可以判断这起食物中毒事件为一次暴发事件,是由同一感染源所引起。这也表明,PFGE 分型技术在食源性疾病的主动监测和暴发调查中显示了绝对的优势,对处理、预防和控制细菌性传染病

流行发挥了重要作用。有些散发株与暴发株的 PFGE 型别一致,提示在广东省可能存在某些优势 PFGE 型别的副溶血弧菌持续流行,不断引起散发和暴发。由于本研究未能取得相关的食品和外环境样本,无法及时进行溯源分析,后续研究和监测应结合分析临床患者、食品和外环境分离株之间的相关性,找到该时期流行的优势菌群及其来源途径,这有利于切断传播途径,真正发挥食源性疾病预防网络的预警与控制作用。

参 考 文 献

[1] Mao XD, Hu JF, Liu XM. Epidemiological characteristics of bacterial foodborne disease during the year 2003–2007 in China [J]. Chin J Food Hygiene, 2010, 22(3) : 224–228. (in Chinese)

毛雪丹,胡俊峰,刘秀梅. 2003—2007 年中国 1 060 起细菌性食源性疾病预防流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(3) : 224–228.

[2] Li JS, Liang JH, Ke BX, et al. Surveillance of forborne disease in Guangdong, 2012 [J]. South Chin J Prev Med, 2013, 39(6) : 10–16. (in Chinese)

李剑森,梁骏华,柯碧霞,等. 2012 年广东省食源性疾病预防监测结果分析[J]. 华南预防医学, 2013, 39(6) : 10–16.

[3] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3) : 268–281.

[4] Zhang H, Sun S, Shi W, et al. Serotype, virulence, and genetic traits of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Shanghai, China [J]. Foodborne Pathog Dis, 2013, 10(9) : 796–804.

[5] Ke BX, Tan HL, Li BS, et al. Etiologic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains causing outbreaks and sporadic cases in Guangdong, 2009 [J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(12) : 1237–1241. (in Chinese)

柯碧霞,谭海玲,李柏生,等. 广东省 2009 年副溶血弧菌暴发与散发菌株的病原学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(12) : 1237–1241.

[6] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3 : K6 and its serovariants [J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1) : 39–48.

[7] Ma C, He DM, Deng XL, et al. Molecular characteristic of dominant serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from foodborne disease outbreaks in Guangdong province [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, 31(12) : 1093–1098. (in Chinese)

马聪,何冬梅,邓小玲,等. 广东地区副溶血性弧菌暴发分离优势血清型菌株的分子特征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(12) : 1093–1098.

[8] Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, et al. Prevalence of the pandemic genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and significance of its distribution across different serotypes [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1) : 284–286.

[9] Okura M, Osawa R, Iguchi A, et al. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10) : 4676–4682.

[10] Nasu H, Iida T, Sugahara T, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6 strains [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6) : 2156–2161.

(收稿日期:2014-08-07)

(本文编辑:万玉立)