

深圳地区 2002—2008 年副溶血弧菌分子特征研究

石晓路 王艺 扈庆华 李迎慧 林一曼 邱亚群 陈琼城 崔志刚

【摘要】 目的 了解深圳地区副溶血弧菌主要血清型和分子分型以及毒力因子分布,分析新 O3:K6 型克隆群与国际流行株的进化关系。方法 对 2002—2008 年深圳地区 1005 株副溶血弧菌临床分离株进行血清型分型;采用荧光 PCR 方法对 68 种不同血清型的 281 株副溶血弧菌进行 *tlh*、*toxR*、*tdh* 和 *trh* 毒力基因检测;对 281 株菌株进行 *orf8* 检测;采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对不同分离时间的 5 种主要血清型菌株进行分子分型,根据有代表性的分子分型图谱选取 82 株副溶血弧菌菌株进行 GS-PCR 检测,并选取 60 株副溶血弧菌菌株进行 *toxRS* 基因测序;进而对 41 株 O3:K6 和 O1:K25 副溶血弧菌菌株进行多位点序列分型 (MLST) 分析,采用 eBURST 软件分析进化关系。结果 1005 株菌共得到 79 种不同的血清型,主要血清型为 O3:K6、O4:K8、O1:K25、O1:KUT、O4:K68、O1:K56 和 O9:K44,所占比例分别为 57.9%、8.16%、5.27%、5.87%、1.39%、1.39% 和 0.99%。243 株为 *tlh* +、*toxR* +、*tdh* +、*trh* -, 37 株为 *tlh* +、*toxR* +、*tdh* - 和 *trh* -, 1 株 *tlh* +、*toxR* +、*tdh* + 和 *trh* +。35 株 O3:K6 型菌株的 MLST 序列类型为 ST3,是同源复合体 CC3,O4:K8 型副溶血弧菌的序列类型为 ST189,无同源复合体。结论 深圳地区主要流行的副溶血弧菌为 *tdh* +、*trh* - 的 O3:K6、O4:K8 和 O1:K25 菌株,2006 年后出现 O1:K56、O9:K44、O3:K29、O4:K9 新的血清型;其中 O3:K6 血清型属于新的 O3:K6 克隆群,与其他国家流行的副溶血弧菌属于同一克隆群,同时也存在新、旧克隆群。血清的多样性和新旧克隆群的存在是造成深圳地区副溶血弧菌腹泻病高发态势的主要原因之一。

【关键词】 副溶血弧菌;毒力特征;脉冲场凝胶电泳;新克隆群特异性 PCR;多位点序列分型

Molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* collected from human infections in Shenzhen, between 2002 and 2008 SHI Xiao-lu¹, WANG Yi¹, HU Qing-hua¹, LI Ying-hui¹, LIN Yi-man¹, QIU Ya-qun¹, CHEN Qiong-cheng¹, CUI Zhi-gang². 1 Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China; 2 National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding authors: CUI Zhi-gang, Email: cuizhigang@icdc.cn; HU Qing-hua, Email: huqinghua03@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81071433) and the National Science and Technology Major Project (No. 2012ZX10004215).

【Abstract】 Objective To determine the occurrence and distribution of specific clones of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* (VP) isolated in Shenzhen and to assess the relationship between serotype O3:K6 and the globally distributed pandemic clone. **Methods** A total of 1005 VPs isolated from diarrhea patients in 2002–2008 were sero-typed. Real-time PCR was used to detect the virulence genes *tlh*, *toxR*, *tdh*, *trh* and *orf8* in 281 isolates from 68 different serotypes. The main serotypes were typed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Strains with dominant serotypes and PFGE patterns were assayed by GS-PCR and *toxRS* sequencing for the identification of pandemic clone. Multilocus sequence typing (MLST) analysis was reserved for exemplary 41 O3:K6 and O1:K25 isolates. **Results** Seventy-nine serotypes were observed among the 1005 isolates, including O3:K6 (57.9%), O4:K8 (8.16%), O1:KUT (5.87%), O1:K25 (5.27%), O4:K68 (1.39%), O1:K56 (1.39%) and

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.06.017

基金项目:国家自然科学基金(81071433);国家科技重大专项(2012ZX10004215)

作者单位:518055 深圳市疾病预防控制中心 深圳市科创委重大传染病防控重点实验室(石晓路、王艺、扈庆华、李迎慧、林一曼、邱亚群、陈琼城);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(崔志刚)

通信作者:崔志刚, Email: cuizhigang@icdc.cn; 扈庆华, Email: huqinghua03@163.com

O9 : K44 (0.99%)。Most of the strains (99.36%) showed PCR positive to *tlh*, *toxR*, and *tdh* but eleven strains were *tdh* negative. MLST showed that all the 36 O3 : K6 isolates belonged to ST3 and all the 5 O4 : K8 strains were ST189. These results matched the description of the pandemic VP clone.

Conclusion A recognizable burden of diarrheal illness caused by VP had been seen in Shenzhen. Results from serotyping indicated that although there existing a large variety of diversities, the dominant serotype appeared to be O3 : K6. VP isolates identified in Shenzhen mainly showed as *tdh* positive but *trh* negative, in consistent with the current pandemic O3 : K6 clone. The pandemic O3 : K6 clone did appear to co-exist with other clones of O3 : K6, as well as O4 : K8, O1 : K25. Potential outbreak of VP could be monitored through the laboratory-based surveillance programs, suggesting that the strategies related to prevention and control of VP should be prioritized in Shenzhen.

【Key words】 *Vibrio parahaemolyticus*; Virulence gene; Pulsed-field gel electrophoresis; GS-PCR; Multilocus sequence typing

副溶血弧菌广泛分布于世界沿海地区,是引起食源性疾病的重要病原菌之一^[1]。1996 年自印度加尔各答分离出一种 *tdh*+、*trh*- 新的 O3 : K6 型克隆群后此菌引起的疾病发生率急剧增加^[2]。目前该克隆群已引起全球许多国家副溶血弧菌疾病大流行^[3,4]。同样在我国特别是沿海地区,副溶血弧菌引起的食物中毒已高居微生物性食物中毒首位^[5,6]。深圳地区是我国副溶血弧菌食物中毒和感染性腹泻的高发区域,副溶血弧菌占腹泻病病原的首位。但目前对深圳地区副溶血弧菌腹泻病的流行规律、菌株血清型分布和毒力因子分布了解甚少,为此对 2002—2008 年该地区副溶血弧菌分离菌株的分子特征进行研究,了解主要流行血清型和分子分型以及毒力因子分布,分析 O3 : K6 血清型是否属于新的 O3 : K6 型克隆群及本地优势克隆群与国际流行株的进化关系等,为该病的防控提供技术支撑。

材料与方法

1. 实验用菌株:2002—2008 年深圳地区 1005 株副溶血弧菌临床分离株。其中食物中毒来源菌株 354 株,感染性腹泻监测来源菌株 558 株,外环境分离菌株 93 株。副溶血弧菌参照菌株 vp08399 (GS-PCR+、*orf8*+、*trh*-) 和 vp08400 (GS-PCR-、*orf8*-、*trh*-) 由浙江大学方维焕教授馈赠, vp08414 (*tdh*-、*trh*+) 和 vp08415 (*tdh*+、*trh*+) 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所阚斌研究员提供。

2. 血清型分型:参照 GB/T 4789.7-2003 对 1005 株菌株进行复核鉴定和血清分型。诊断血清为日本生研公司产品。

3. 毒力因子检:选取 68 种不同血清型的 281 株副溶血弧菌进行 *tlh*、*toxR*、*tdh*、*trh* 荧光 PCR 检测,其中 237 株为临床分离株,44 株为外环境分离株。自行设计荧光探针及引物,反应条件和引物探针序列见文献 [7]。在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪或 Strategene 荧光 PCR 仪完成毒力因子检测。

4. 分子分型:

(1) 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型:按时间、地点差异,选取代表性的 190 株 (O3 : K6 型 142 株、O4 : K8 型 18 株、O1 : KUT 型 11 株、O4 : K68 型 9 株、O1 : K25 型 10 株) 进行 PFGE^[8,9],并用 Bionumerics 软件进行图谱分析。

(2) 新流行菌株标志物检测:根据 PFGE 图谱选取具有代表性的 281 株进行 *orf8* 检测,其中 82 株进行 GS-PCR 检测,并选取 60 株 (O3 : K6 型 31 株、O4 : K8 型 7 株、O1 : K25 型 8 株、O4 : K68 型 4 株、O1 : KUT 型 10 株) 的 *toxRS* 基因测序以验证 GS-PCR 结果。应用 PCR 直接测序法对其 *toxRS* 基因进行扩增测序^[10] (由上海生工生物工程有限公司完成)。利用 Primer Premier 5.0 设计两对引物,序列见表 1。

(3) MLST 分型:根据 PFGE 分型结果选取 41 株副溶血弧菌 (36 株 O3 : K6 和 5 株 O4 : K8 型) 进行 MLST 分型。参照 MLST 数据库 (<http://pubmlst.org>) 公布的 6 对引物分别对 *dnaE*、*gyrB*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC* 和 *tnaA* 基因进行扩增测序 (本研究根据 *recA* 基因重新设计了引物,即 F:GCT TTC TCT TGA TAT CGC TTT GGG; R:GCT TTT TCT ACT AGC TTG TGC TT,优化 PCR 扩增条件)。引物由 TaKaRa 公司合成。对 7 个位点的目的片段测序结果进行核酸序列信息进行整合,把每个等位基因的 DNA 片段与 MLST 数据库的相应基因进行比较,从而得到等位基因图谱。并采用 eBURST 软件分析进化关系。

结 果

1. 血清型分布:1005 株副溶血菌株共鉴定出 79 种不同的血清型,其中菌株数 ≥5 的血清型有 21 种。较为常见的血清型有 O3 : K6、O4 : K8、O1 : K25、O1 : KUT、O4 : K68、O1 : K56 和 O9 : K44,其中 O3 : K6 型的比例为 57.9%,其他常见血清型分别为 8.16%、5.27%、5.87%、1.39%、1.39% 和 0.99%。而 2006 年以后出现新的血清型有 O1 : K56、O9 : K4、

表1 PCR反应的探针和引物及反应条件

基因	引物	探针	反应条件
<i>tdh</i>	tdh-F: AAACATTTGCCTTTGAGCTTCCA	FAM-CCG GGG TGT CCC TTT TCC	95 °C/3 min, 40个循环(95 °C/15 s, 55 °C/60 s)
	tdh-R: CTCGAACAACAACAATATCTCATCAG	TGC CCC CGG-DAB CYL	
<i>toxR</i>	toxR-F: GAAGTTGTACGATTAGGAAGC	FAM-CCG CCC GTA TAC TCC TGA	95 °C/3 min, 40个循环(95 °C/15 s, 55 °C/60 s)
	toxR-R: TGCTCACGCCAAACAAC	TGT TGG CGG-DAB CYL	
<i>tlh</i>	tlh-F: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	FAM-AAG AAC TTC ATG TTG ATG	95 °C/2 min, 40个循环(95 °C/30 s, 56 °C/30 s, 72 °C/40 s)
	tlh-R: GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC	ACA CT-BHQ1	
<i>trh</i>	trh-F: GCCAAGTGTAAACGTATTTGGATGA	FAM-ACG CCA GAA TAT TTC GTC	95 °C/3 min, 40个循环(95 °C/20 s, 60 °C/60 s)
	trh-R: TGCCCATTTCCGCTCTCA	AAT GTC GAA GC-BHQ1	
<i>orf8</i>	Orf8-F: AGGACGCAGTTACGCTTGATG	FAM-AAG CCA TTA ACA GTT	95 °C/2 min, 40个循环(95 °C/30 s, 56 °C/30 s, 72 °C/40 s)
	Orf8-R: CTAACGCATTGTCCCTTTGTAG	GAA GGC GTT GAC T-DAB CYL	
<i>toxRS1</i>	toxRS1-F: ATCGTAGAGCCGCTTTAGC	-	94 °C/5 min, 40个循环(94 °C/60 s, 54 °C/60 s, 72 °C/60 s), 72 °C/10 min
	toxRS1-R: ACCGTAGAACCGTGATTAG	-	
<i>toxRS2</i>	toxRS2-F: ACAATGACGCCTCTGCTAAT	-	94 °C/5 min, 40个循环(94 °C/60 s, 52 °C/60 s, 72 °C/60 s), 72 °C/10 min
	toxRS2-R: CTCACTTCCCAGCGACCTTT	-	
GS-VP	GS-VP.1-F: TAATGAGGTAGAAAACA	-	94 °C/5 min, 30个循环(94 °C/60 s, 494 °C/60 s, 72 °C/60 s), 72 °C/10 min
	GS-VP.2-R: ACGTAACGGCCTACA	-	

O3: K29和O4: K9。外环境分离株血清型较分散, 93株中O1: KUT型11株, O3: K6型4株, O1: K25型2株, O4: K8型和O4: K68型各1株。

2. 毒力因子分布: 281株中有232株(6株为外环境分离株)为*tlh+*、*toxR+*、*tdh+*、*trh-*, 37株(外环境分离株)为*tlh+*、*toxR+*、*tdh-*、*trh-*, 11株(腹泻病例分离株)为*tlh+*、*toxR+*、*tdh-*、*trh-*, 1株(食品分离株)为*tlh+*、*toxR+*、*tdh+*、*trh+*。

3. 分子分型:

(1) PFGE分型: 通过PFGE分析, 190株菌得到74种图谱, 其中142株O3: K6型菌有45种、18株O4: K6型菌有8种、11株O1: KUT型菌有10种、9株O4: K68型菌有5种、10株O1: K25型菌有6种PFGE图谱。提示深圳地区存在多起副溶血弧菌引起的腹泻病或食物中毒暴发。

(2) 新流行菌株标志物检测: ORF8-PCR检测68种不同血清型的281株副溶血弧菌, 在18种不同血清型的150株菌中检测到*orf8*基因。O3: K6、O1: K25等常见血清型均存在*orf8*基因, 其中O4: K8、O1: K56和O9: K44血清型未检出*orf8*基因(表2)。

对82株副溶血弧菌进行GS-PCR检测, 并选取60株进行*toxRS*测序, 以了解菌株在*toxRS*基因不同位点上的突变情况(表3)。O4: K8型菌的GS-PCR和*orf8* PCR检测结果均为阴性, 测序结果也显示所有O4: K8型菌株都不属于新流行菌株, 而与典型的旧克隆群相比这些菌株在1002 bp处也存在突变。GS-PCR检测与测序结果一致(表4), 1类型菌株其GS-PCR均为阳性, 其他类型菌株GS-PCR结果均为阴性。GS-PCR检测结果显示大部分O3: K6型菌为新克隆群, O4: K68型菌存在新旧克隆群, O4: K8

表2 150株不同血清型副溶血弧菌的*orf8*基因分布

血清型	<i>orf8</i> 基因		阳性率 (%)
	阳性株数	阴性株数	
O3: K6	64	7	90.14
O1: K25	6	9	40.00
O1: KUT	2	20	9.10
O4: K68	9	2	81.81
O1: K36	6	0	100.00
O1: K32	1	2	33.33
O3: KI	2	0	100.00
O3: KIV	1	0	100.00
O3: K54	1	0	100.00
O4: K55	2	1	66.67
O4: K42	1	0	100.00
O4: K36	1	0	100.00
O4: K11	2	1	66.67
O4: K63	1	1	50.00
O5: K68	1	0	100.00
O11: K19	1	0	100.00
O11: K36	1	0	100.00
OUT: KUT	2	3	40.00

型菌为旧克隆群。

(3) MLST分型: 35株O3: K6型菌具有相同的MLST序列类型, 7个位点*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*didS*、*pntA*、*pyrC*和*tnaA*的等位基因图谱按顺序是3、4、19、4、29、4和22, 序列类型为ST3。6株O4: K8型菌具有相同的MLST序列类型, 7个位点*dnaE*、*gyrB*、*recA*、*didS*、*pntA*、*pyrC*和*tnaA*的等位基因图谱按顺序是11、48、3、48、26、48和26, 序列类型为ST189。

采用eBURST_v3软件分析41株副溶血弧菌, 并与数据库公布的菌株进行比对(图1)。35株ST3与ST2、ST51、ST42等8种序列类型的菌株构成同源复合体(clonal complex)CC3。CC3对应的是流行菌

表 3 *toxRS* 基因部分片段的序列分析

血清型	576 nt	900 nt	1002 nt
新 O3 : K6	GGTAGAAAC A ATCGTAGAG.....GGAAGT A ATTGCCA.....GGTCAAAA T GATCCAACAGA...		
旧 O3 : K6	GGTAGAAAC G ATCGTAGAG.....GGAAGT G ATTGCCA.....GGTCAAAA C GATCCAACAGA...		
1	GGTAGAAAC A ATCGTAGAG.....GGAAGT A ATTGCCA.....GGTCAAAA T GATCCAACAGA...		
2	GGTAGAAAC G ATCGTAGAG.....GGAAGT G ATTGCCA.....GGTCAAAA C GATCCAACAGA...		
3	GGTAGAAAC C ATCGTAGAG.....GGAAGT G ATTGCCA.....GGTCAAAA T GATCCAACAGA...		
4	GGTAGAAAC C ATCGTAGAG.....GGAAGT A ATTGCCA.....GGTCAAAA C GATCCAACAGA...		
5	GGTAGAAAC G ATCGTAGAG.....GGAAGT A ATTGCCA.....GGTCAAAA T GATCCAACAGA...		
6	GGTAGAAAC G ATCGTAGAG.....GGAAGT G ATTGCCA.....GGTCAAAA T GATCCAACAGA...		

血清型	1196 nt	1214 nt	1244 nt	1463 nt
新 O3 : K6	AGACGATAC T GTAGGCC.....GTTACGTCG T GT.....TACCT A CCGAAT.....ATGC T GAACAA			
旧 O3 : K6	AGACGATAC C GTAGGCC.....GTTACGTCG A GT.....TACCT G CCGAAT.....ATGC A GAACAA			
1	AGACGATAC T GTAGGCC.....GTTACGTCG T GT.....TACCT A CCGAAT.....ATGC T GAACAA			
2	AGACGATAC C GTAGGCC.....GTTACGTCG A GT.....TACCT G CCGAAT.....ATGC A GAACAA			
3	AGACGATAC C GTAGGCC.....GTTACGTCG A GT.....TACCT G CCGAAT.....ATGC A GAACAA			
4	AGACGATAC C GTAGGCC.....GTTACGTCG A GT.....TACCT G CCGAAT.....ATGC A GAACAA			
5	AGACGATAC C GTAGGCC.....GTTACGTCG A GT.....TACCT G CCGAAT.....ATGC A GAACAA			
6	AGACGATAC T GTAGGCC.....GTTACGTCG T GT.....TACCT G CCGAAT.....ATGC A GAACAA			

表 4 *toxRS* 7 个位点的碱基突变

碱基突变类型	菌株在 <i>toxRS</i> 7 个位点的碱基突变	血清型	菌株数
1	---A---A---T---T---A---T---	O3 : K6	26
		O1 : K25	4
		O4 : K68	2
		O1 : KUT	2
2	---G---G---C---C---A---G---A---	O3 : K6	1
		O1 : K25	2
		O1 : KUT	8
3	---G---G---T---C---A---G---A---	O3 : K6	1
		O4 : K8	7
		O1 : K25	1
		O4 : K68	2
4	---G---A---C---C---A---G---A---	O3 : K6	1
		O1 : KUT	1
5	---G---A---T---C---A---G---A---	O1 : KUT	1
6	---G---G---T---T---G---A---	O1 : KUT	1

株, 而 ST3 型菌株是在此同源复合体中最原始的菌株, 曾在日本、泰国、美国、西班牙、秘鲁等多个国家分离到。ST189 型菌株无同源复合体。ST189 与 ST88 型菌株属于单位点变异体 (single-locus variant, SLV), 只在 *recA* 基因序列上不同。1995 年和 1996 年曾在秘鲁分离到 ST88 型 O4 : K8 型菌株; 在我国其他地区也存在 ST189 型菌株, 但与深圳地区的菌株血清型不同。

讨 论

自 1953 年在日本首次发现副溶血弧菌, 至今已有 13 种 O 血清型和 71 种 K 血清型。1996 年以前, 副溶血弧菌的血清型主要以 O4 : K8 为主, 1996 年后, 新的 O3 : K6 型克隆群占主要优势, 并引起副溶血弧菌腹泻发病率增高^[11-13]。本研究显示, 深圳地区副溶血弧菌血清型有 75 种, 其中以 O3 : K6、O4 : K8、O4 : K68、O1 : K25 和 O1 : KUT 型为主, 同时还出现 O1 : K56、O9 : K44、O3 : K29 和 O4 : K9 新血清型。主要流行血清型与世界许多国家目前流行的优势菌株的血清型一致, 同时又存在多种新的血清型。血清型的多样性是深圳地区副溶血弧菌腹泻病呈高发态势的原因之一。

一般认为, 副溶血弧菌的致病作用主要与其溶血素密切相关^[14]。目前研究最多的是耐热直接溶血素 (TDH) 和耐热溶血素相关溶血素 (TRH), 分别由 *tdh* 和 *trh* 基因编码。本研究显示实验菌株 100% 携带 *toxR* 和 *tlh*, 因此 *toxR* 和 *tlh* 可作为副溶血弧菌检测的标志物, 进行早期快速诊断。临床分离株基本都

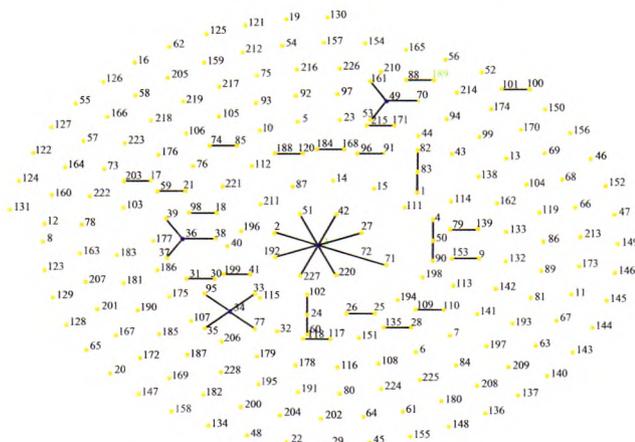


图 1 41 株副溶血弧菌进化关系 (采用 eBURST 软件分析)

含 *tdh* 基因, 食品样本分离株仅 6% 含 *tdh*, 同时分离出 1 株 O3 : K6 型菌; 同时从腹泻病例标本分离的 11 株菌缺失 *tdh* 和 *trh* 基因, 其原因还有待进一步研究。

由于 1996 年后全球流行的副溶血弧菌为 O3 : K6 新克隆群, 为了解深圳地区主要血清型是否为新的克隆群, 以及流行血清型与国际流行株型的亲缘关系, 本研究采用分子分型手段 (ORF8-PCR 和 GS-PCR) 进行分析。Matsumoto 等^[10]证实新 O3 : K6 型流行株在 *toxRS* 操纵子上存在特别序列, 与旧 O3 : K6 型菌株相比, 在 576、900、1002、1196、1214、1244 和 1463 bp 位点上存在突变。GS-PCR 是根据 *toxRS* 上 1364 bp 区域 7 个碱基突变来区分流行和非流行克隆群菌株。ORF8 来自于丝状噬菌体, 是一个开放阅读框, 也是副溶血弧菌的另一种黏附因子, 其编码的黏附蛋白可增强副溶血弧菌对宿主细胞的黏附能力。本研究食物中毒和腹泻病患者分离株近 50% 含 ORF8, 但外环境菌株中含 ORF8 的菌株则少, 因此外环境中是否存在流行菌株还有待进一步研究。在 GS-PCR 的基础上, 对 60 株副溶血弧菌 *toxRS* 的部分序列进行测序, 结果显示 O3 : K6 型菌株除 1 株外均为新的流行菌株, 在 O4 : K68、O1 : 25 和 O1 : KUT 型菌株中既存在新流行菌株也有旧克隆群。结合 PFGE 结果, O4 : K68 和 O1 : K25 型新流行菌株常引起副溶血弧菌腹泻病暴发。值得注意的是, O4 : K8 型菌不是新流行菌株, 与旧克隆群相比这些菌株在 1002 bp 处存在突变。但是结合 PFGE 结果, O4 : K8 型菌在深圳地区仍可引起暴发。此外, 本研究中 3 株菌的 ORF8-PCR 和 GS-PCR 结果不一致 (2 株 ORF8-PCR-、GS-PCR+, 1 株 ORF8-PCR+, GS-PCR-)。提示仅采用 ORF8-PCR 和 GS-PCR 标志物不能完全确认新旧克隆群, 需结合多个指标分析。

2002—2008 年分离的 35 株具有代表性的 O3 : K6 型副溶血弧菌具有相同的 MLST 序列, 均属于 ST3, 是最普遍的流行克隆群类型图谱, 表明近些年深圳地区流行的 O3 : K6 型菌均属于新的 O3 : K6 型克隆群, 与国际流行株的进化关系一致。6 株 O4 : K8 型菌的序列类型为 ST189, 目前在 MLST 数据库 (<http://pubmlst.org>) 中尚未找到与其序列类型相同的血清型菌株。

综上所述, 深圳地区副溶血弧菌主要是 *tdh* +、*trh*-、GS-PCR+ 新流行菌株, 这是引起疾病暴发或散发的主要流行株型, 同时出现引起爆发性疫情的新血清型, 还存在一些与新流行菌株分子特征不同的菌株, 如 O4 : K8 型菌的 *toxRS* 基因存在点突变, 而

副溶血弧菌多种血清型, 使腹泻病呈现复杂和多样性, 且外环境分离株的血清型与临床分离株主要血清型不一致, 也可能是导致该地区副溶血弧菌腹泻疾病负担重, 难以得到有效预防和控制的原因之一。

参 考 文 献

- [1] WHO. Food safety, a worldwide challenge. Food Chain, 2001.
- [2] Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, et al. Emergence of a unique O3 : K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3150-3155.
- [3] Martinez UJ, Simental L, Velasco D, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6, Europe. Emerg Infect Dis, 2005, 11(8): 1319-1320.
- [4] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3 : K6 and its serovariants. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1): 39-48.
- [5] Lan QX, Lin YM, Shi XL, et al. Laboratory analysis of *Vibrio parahaemolyticus* from food poisoning in Shenzhen in 2007. Chin J Health Lab Technol, 2009, 19(11): 2570-2571. (in Chinese) 兰全学, 林一曼, 石晓路, 等. 深圳市 2007 年食物中毒分离副溶血弧菌的实验室分析. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2570-2571.
- [6] Shen ZY, Gao WJ, Wang HH, et al. Analysis of the detection result of pathogen in bacterial food poisoning from 2001 to 2009. Mod Prev Med, 2011, 38(1): 30-33. (in Chinese) 沈志英, 高文洁, 王恒辉, 等. 2001—2009 年细菌性食物中毒病原菌检测结果分析. 现代预防医学, 2011, 38(1): 30-33.
- [7] Wang Y, Hu QH, Mou J, et al. Etiologic and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from diarrheal 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.
- [8] Parsons MB, Cooper KL, Kubota KA, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. Foodborne Pathog Dis, 2007, 4(3): 285-292.
- [9] 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.
- [10] Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, et al. Pandemic spread of an O3 : K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 578-585.
- [11] Vuddhakul V, Chowdhury A, Laohaprerthisan V, et al. Isolation of a pandemic O3 : K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(6): 2685-2689.
- [12] Osawa R, Iguchi A, Arakawa E, et al. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6 still open to question. J Clin Microbiol, 2002, 40(7): 2708-2709.
- [13] Wong HC, Liu SH, Wang TK, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6 from Asia. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(9): 3981-3986.
- [14] Davis CR, Heller LC, Peak KK, et al. Real-time PCR detection of the thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes in a *Vibrio parahaemolyticus* cultured from mussels and mussel homogenate associated with a foodborne outbreak. J Food Prot, 2004, 67(5): 1005-1008.

(收稿日期: 2013-01-22)

(本文编辑: 张林东)