

# 深圳市2007—2008年腹泻病副溶血弧菌监测及分子特性分析

王艺 扈庆华 牟瑾 林一曼 兰全学 石晓路 马汉武 程锦泉 杨志荣

**【摘要】** 目的 了解深圳地区2007年和2008年腹泻病副溶血弧菌感染状况和临床分离株的分子生物学特征。方法 4个哨点监测医院每月至少对80份腹泻病例的粪便样本进行致病菌分离培养。对所分离的361株副溶血弧菌进行血清型分型和两个主要毒力基因 *tdh* 和 *trh* 的检测。对2007年8月和2008年9月6个疑似腹泻暴发地点的60株O3:K6型副溶血弧菌分离株进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型。结果 4个哨点监测医院共检测4384份标本,分离出361株副溶血弧菌,361株副溶血弧菌分属于28种不同的血清型,其中O3:K6型占67.90%,其次是O4:K8和O1:KUT血清型,所占比例分别为7.50%和6.10%。深圳地区腹泻病副溶血弧菌临床分离株主要是 *tdh*+*trh*- 菌株,361株菌株中有337株是 *tdh*+*trh*- 菌株,11株为 *tdh*-*trh*- 菌株,13株为 *tdh*+*trh*+ 菌株。60株副溶血弧菌分型得到20种图谱类型,分别属于3个克隆群。分离自同一个地点的副溶血弧菌菌株具有相同的PFGE图谱,来自不同年份的菌株仅有部分菌株有相同的PFGE图谱。结论 深圳地区腹泻患者的副溶血弧菌分离菌株主要以O3:K6型为主,大部分菌株携带 *tdh* 基因,少数携带 *trh* 基因。来自6个地点的副溶血弧菌都具有相同的PFGE图谱,说明该地区存在副溶血弧菌腹泻病的暴发。但2007年和2008年菌株的PFGE图谱又不相同,说明副溶血弧菌的来源存在多样性。

**【关键词】** 副溶血弧菌; 腹泻; 脉冲场凝胶电泳; 毒力基因

**Etiologic and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from diarrheal patients in Shenzhen, in 2007–2008** WANG Yi<sup>1</sup>, HU Qing-hua<sup>2</sup>, MU Jin<sup>2</sup>, LIN Yi-man<sup>2</sup>, LAN Quan-xue<sup>2</sup>, SHI Xiao-lu<sup>2</sup>, MA Han-wu<sup>2</sup>, CHENG Jin-quan<sup>2</sup>, YANG Zhi-rong<sup>1</sup>. 1 College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2 Shenzhen Center for Diseases Control and Prevention Corresponding author: YANG Zhi-rong, Email: bioyang@163.com; HU Qing-hua, Email: huqinghua03@163.com

This work was supported by a grant from the National Key Project of Science and Technology for AIDS and Viral Hepatitis Infectious Diseases etc. Treatment and Control(No.2008ZX10004-008)

**【Abstract】 Objective** To study the infection status and the molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diarrheal patients in Shenzhen, in 2007 to 2008 and to provide evidence for the prevention and control of diarrheal diseases caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** More than 80 fecal specimens from four sentinel surveillance hospitals were collected and cultured each month. A total of 361 isolates of *Vibrio parahaemolyticus* were sero-typed and examined by real-time PCR for the presence of two major virulence genes, *tdh* and *trh*. Of 361 strains, 60 O3:K6 strains isolated from six suspected outbreaks in August, 2007 and in September, 2008 were typed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** 4384 stool samples were detected in four sentinel surveillance hospitals and with 361 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated that belonged to 28 serotypes. Serotype O3:K6, O4:K8 and O1:KUT accounted for 67.90%, 7.50% and 6.10%, respectively. Of 361 strains, 337 strains belonged to *tdh*+*trh*-, 11 strains were *tdh*-*trh*- and 13 strains were *tdh*+*trh*+. The most prevalent serotype which caused diarrheal diseases was *tdh*+*trh*- in Shenzhen. The 60 isolates were discriminated into twenty different PFGE patterns, which belonged to three clones. Among the 60 isolates, most of the PFGE patterns of isolates from the suspected

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.013

基金项目: 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项(2008ZX10004-008)

作者单位: 610064 成都, 四川大学生命科学学院(王艺、杨志荣); 深圳市疾病预防控制中心(扈庆华、牟瑾、林一曼、兰全学、石晓路、马汉武、程锦泉)

通信作者: 杨志荣, Email: bioyang@163.com; 扈庆华, Email: huqinghua03@163.com

outbreak locations were identical and some strains isolated from different year were different. **Conclusion** *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Shenzhen were dominated by O3:K6 strains. Most of these isolates carried *tdh* gene and few carried *trh* gene. Meanwhile, the identical patterns of isolates from 6 suspected outbreaks locations demonstrated that *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks occurred in July 2007 and in September 2008 in Shenzhen. However, the dominated strains' PFGE patterns were different each year, indicating that the sources of *Vibrio parahaemolyticus* had a multiplex nature and the multiplex sources such as water, sea food and pickled products should be integrated monitored. Laboratory based surveillance of diarrheal diseases could contribute in establishing early warning system for the better prevention and control of diarrheal diseases.

**[Key words]** *Vibrio parahaemolyticus*; Diarrhea; Pulsed-field gel electrophoresis; Virulence gene

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是广泛分布于世界沿海地区的一种革兰阴性嗜盐杆菌,是引起食源性疾病的主要病原菌之一,也是我国沿海地区食物中毒和夏季腹泻的重要病原。近年来,副溶血弧菌引起的胃肠感染逐年上升。我们自2007年开展感染性腹泻病原谱的哨点监测,2007—2008年监测数据显示,深圳市引起细菌性感染腹泻的病原主要以副溶血弧菌为主,所占比例达到致病菌总数的67.2%。为了解该地区副溶血弧菌的感染状况,掌握传染源,对深圳市2007年和2008年腹泻病例副溶血弧菌分离菌株进行研究。

## 材料与方法

### 1. 腹泻病副溶血弧菌监测:

(1)样本来源:根据地域位置代表性、流行病学特点选择深圳市4家医院(北京大学深圳医院、龙华医院、西乡人民医院、龙岗区中心医院)作为哨点进行副溶血弧菌的监测。每个哨点每月至少对80份腹泻病例粪便样本进行致病菌分离培养。监测病例的纳入标准为每日排便 $\geq 3$ 次,且粪便性状有改变呈稀便、水样便、黏液便或脓血便;排除标准为服用抗生素、不恰当服用化学物质、食用毒蕈等导致的腹泻、明确诊断为阿米巴痢疾等寄生虫腹泻的病例和慢性腹泻超过2周的病例。

(2)分离鉴定试剂:所需生化培养基和生化试剂均购自北京陆桥技术有限公司;API 20E、API 20NE 鉴定试剂条和 VITEK2 鉴定卡(GN卡)均为法国生物梅里埃公司产品;副溶血弧菌11种O型血清、9种K多价及65种单价血清型购自日本生研公司。

(3)分离鉴定方法:参照国家标准 GB/T 4789.7-2003 进行副溶血弧菌的检测<sup>[1]</sup>。血清鉴定时将菌接种到三糖铁琼脂上,过夜培养,用于K型血清的鉴定。用棉签将TBS斜面上剩下的菌刮到盛有500  $\mu$ l的离心管中,121  $^{\circ}$ C干浴1 h,然后离心,倒掉

一部分上清后振荡,然后用于O型血清的鉴定。

### 2. 副溶血弧菌毒力基因分析:

(1)模板制备:取增菌液1000  $\mu$ l,10 000 r/min离心5 min,弃上清液,加入200  $\mu$ l灭菌纯水于沉淀中,振荡混匀,置100  $^{\circ}$ C水浴加热5 min,10 000 r/min离心1 min,保留上清备用。

(2)荧光PCR反应:根据GenBank公布的*tdh*序列自行设计引物和探针。*tdh*引物和探针序列为:*tdh*-F: AAA CAT TTG CCT TTG AGC TTC CA, *tdh*-R: CTC GAA CAA CAA ACA ATA TCT CAT CAG, *tdh*-P: FAM-CCG GGG TGT CCC TTT TCC TGC CCC CGG-DABCYL。反应程序为:预变性95  $^{\circ}$ C 3 min,然后变性95  $^{\circ}$ C 5 s,退火55  $^{\circ}$ C 60 s,循环40次;参照Davis等<sup>[2]</sup>报道的*trh*引物序列为:*trh*-F: GCC AAG TGT AAC GTA TTT GGA TGA, *trh*-R: TGC CCA TTT CCG CTC TCA, *trh*-P: FAM-ACG CCA GAA TAT TTC GTC AAT GTC GAA GC-BHQ1;*trh*反应程序为预变性95  $^{\circ}$ C 3 min,然后变性95  $^{\circ}$ C 20 s,退火60  $^{\circ}$ C 60 s,循环40次;所有荧光PCR检测均由ABI7500荧光定量PCR仪或Stratagene 3005P PCR仪完成。

3.脉冲场凝胶电泳(PFGE):脉冲场电泳仪为Gene Path™ System (Bio-rad),凝胶成像系统为Quantity One (4.4.0, Bio-rad),分析软件为BioNumerics (Version 3.0, Applied Maths)。PFGE试剂包括Seakem Gold胶(Cambraex Bio Science Rockland)、蛋白酶K(MERCK)、限制性内切酶Not I (NEB)和Xba I (NEB)。PFGE分型的分子质量参考标准菌株为沙门菌H9812。

监测数据显示,深圳市2007年和2008年主要的血清型为O3:K6型,2007年8月和2008年9月宝安区6个地点(固戍村、流塘村、桃源居、黄麻布村、九围村、鹤洲村)腹泻病聚集性病例增加,且血清型以O3:K6型为主,因此选取这6个地点分离的60株O3:K6型副溶血弧菌菌株进行PFGE分型。参照美

国疾病预防控制中心推荐的霍乱弧菌PFGE标准方法,并根据Parsons等<sup>[3]</sup>的研究进行改善。步骤包括胶块的制备、裂解、洗涤、酶切(副溶血弧菌用内切酶Not I,沙门菌H9812用内切酶Xba I)、电泳。电泳程序:起始转换时间为10 s,最终转换时间为35 s,电泳时间为19 h。电泳结束后,将胶块用EB染色,纯水洗涤,凝胶成像系统拍照。最后用软件BioNumerics分析电泳图谱,得到菌株的聚类分析树状图。

## 结 果

1. 菌株监测:2007年和2008年深圳市4家哨点医院共检测腹泻病例标本4384份,分离得到361株副溶血弧菌,鉴定出O3:K6、O4:K8、O1:KUT、O1:K36、O4:K9、O4:K68、O2:K3、O3:KUT、O3:KI等28种血清型,其中O3:K6血清型菌株有245株(67.90%),其次是O4:K8和O1:KUT血清型,菌株分别为27株(7.50%)和22株(6.10%)(表1)。

表1 2007年和2008年深圳市副溶血弧菌主要血清型的菌株数和构成比

血清型	菌株数		构成比 (%)
	2007年	2008年	
O3:K6	152	93	67.90
O1:KUT	2	20	6.10
O4:K8	11	16	7.50
O1:K36	5	4	2.50
O4:K9	1	6	1.90
其他	27	23	16.60

2. 毒力基因特征:对361株副溶血弧菌菌株携带耐热溶血素基因*tdh*和耐热相关溶血素基因*trh*进行PCR检测。结果337株为*tdh*+*trh*-菌株,11株为*tdh*-*trh*-菌株,13株为*tdh*+*trh*+菌株。可见引起该地区腹泻病暴发的菌株主要是*tdh*+*trh*-菌株,其所占比例达到93.40%。携带*tdh*基因的菌株比例达到96.95%,携带*trh*基因的菌株比例为3.60%。

3. PFGE分型:对2007年8月和2008年9月该市宝安区6个腹泻病疑似暴发点(固戍村、流塘村、桃源居、黄麻布村、九围村、鹤洲村)分离的60株O3:K6型副溶血弧菌菌株进行PFGE分型。结果共得到20种不同的PFGE图谱类型,图1中自上而下分别命名为VPN11001、VPN11002……VPN11020。根据菌株图谱类型,可将这些菌株分为3个大的克隆群,其中图谱类型为VPN11001~VPN11006菌株属于第1克隆群,VPN11007~VPN11015菌株属于第2克隆群,VPN11016~VPN11020菌株属于第3克隆群。在每

个克隆群内菌株图谱条带的差异均小于3条,菌株之间具有很近的亲缘关系。在2007年分离株和2008年分离株中均可分型得到图谱VPN11004、VPN11010和VPN11011这三个类型的图谱,提示这些菌株可能来自于同一传染源。但是,2007年和2008年又分别有不同图谱的菌株在腹泻病患者中占有优势,例如2007年有图谱类型VPN11002的菌株,2008年有图谱类型VPN11014的菌株,说明这两年分离得到的菌株存在差异,且每年都有不同的优势菌株出现。另外,由图1可知,在同一时间段内,来自6个腹泻病疑似暴发点的分离菌株许多具有相同的PFGE图谱类型,提示这6个地点存在副溶血弧菌腹泻病的暴发,且这些菌株来自同一传染源。对于来自同一疑似暴发点而分离自不同时间的菌株,也存在图谱相同的菌株,如具有相同PFGE图谱的2007年菌株(VP07087和VP07095)和2008年菌株(VP08179)均来自于固戍村,2007年菌株VP07101和2008年菌株VP08323均来自流塘村,说明2007年流行菌株在2008年时仍会引起腹泻病的暴发或流行。

## 讨 论

副溶血弧菌感染腹泻近几年在日本及欧美国家呈上升趋势,菌株主要血清型以O3:K6新克隆群为主。深圳市2005年感染性腹泻病例急剧增加,为此我们在2007年和2008年对腹泻病患者进行监测。结果表明,深圳市副溶血弧菌引起的腹泻病占细菌感染性腹泻的67.2%,菌株阳性检出率在每年的6—10月出现高峰,副溶血弧菌主要以O3:K6血清型为主,其构成比例约为67.90%。

副溶血弧菌阳性检出率在2007年8月和2008年9月达到最高峰。2007年每月平均气温(℃)分别为15.6、19.5、20.1、21.5、26.4、28.3、29.7、28.2、27.8、25.6、20.5和19.0;2008年分别为14.8、12.6、20.3、23.1、25.6、26.6、28.2、28.3、28.6、26.2、21.4和17.8(查询参考网址:<http://www.121.com.cn/main/qhpi/yqhyspj/index.shtml>)。其中2007年8月和2008年9月的气温均相对较高,而该两月副溶血弧菌引起的腹泻病病例数也达到最高峰,说明副溶血弧菌感染的流行与气候有关。

国外报道耐热溶血素(TDH)和耐热相关溶血素(TRH)均是副溶血弧菌引起腹泻的主要毒力因子<sup>[4-6]</sup>。为此我们检测了分离菌株TDH基因*tdh*和TRH基因*trh*。结果表明,深圳地区引起腹泻病暴发

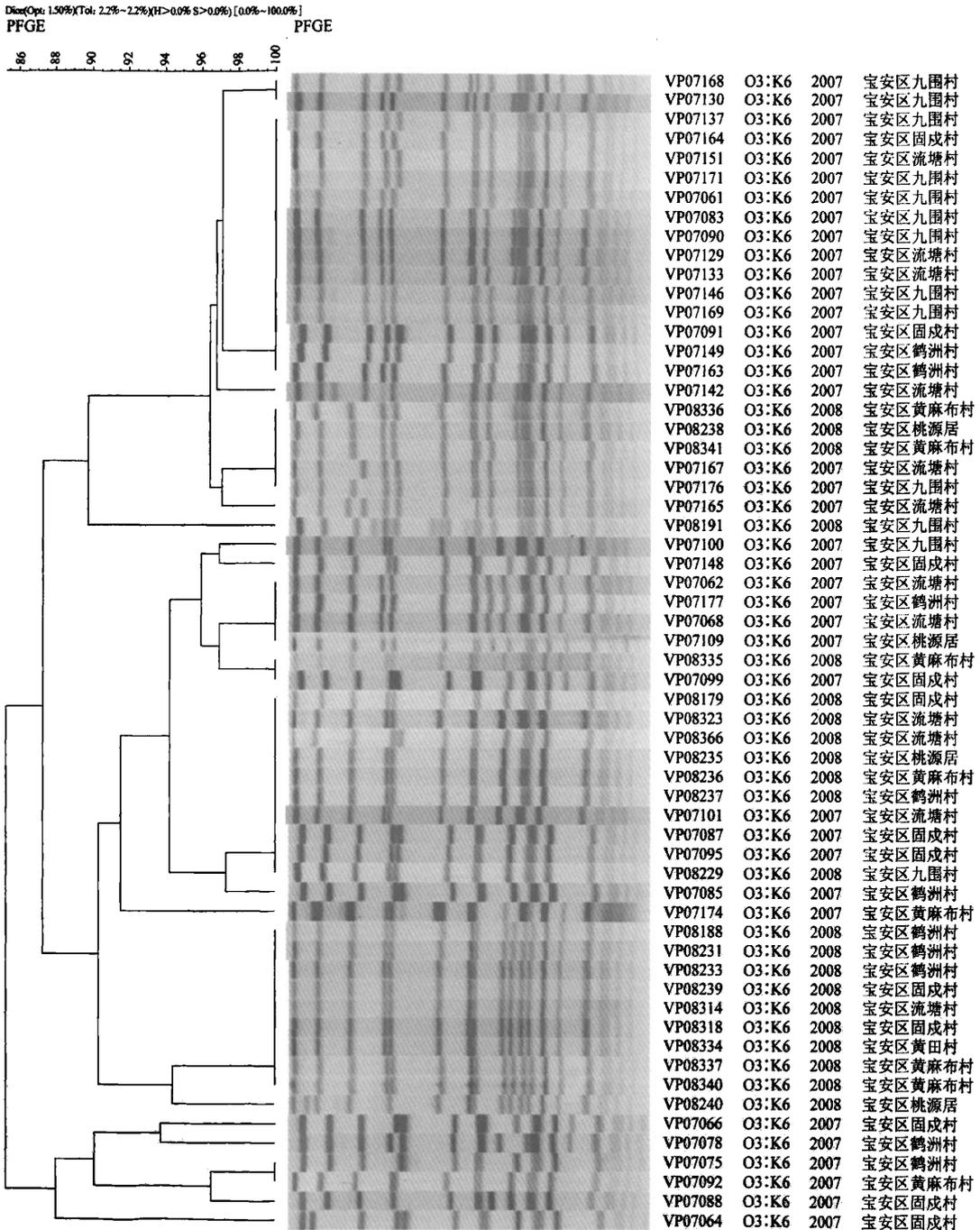


图1 60株O3:K6型副溶血弧菌的PFGE图谱

的副溶血弧菌主要(93.4%)是 *tdh*+*trh*-菌株,少数为 *tdh*-*trh*-和 *tdh*+*trh*+菌株。Bhoopong 等<sup>[7]</sup>也有相似报道,但与之不同的是本研究未检测到 *tdh*-*trh*+菌株。

2007年8月和2008年9月深圳市腹泻病病例急剧增加,其中有6个腹泻病疑似暴发点聚集性病例

明显增加,在这个时期内分离的副溶血弧菌菌株分别占66.0%和49.4%,血清型主要以O3:K6为主。利用PFGE技术对这6个地点的60株O3:K6型副溶血弧菌分离株进行分子分型,表明同一时期各地点分离的副溶血弧菌菌株大部分具有相同的PFGE图谱。结合流行病学监测结果和PFGE实验数据分

析,证实这6个地点均存在副溶血弧菌腹泻病暴发,且各地点之间的部分分离菌株也具有相同的图谱类型,提示深圳地区存在副溶血弧菌腹泻病的暴发。

PFGE分析结果显示,不同年份分离的副溶血弧菌大部分菌株在亲缘关系上存在差异,其中2007年的菌株主要属于第1克隆群和第3克隆群,2008年的菌株主要属于第2克隆群。不同年份有着不同的引起腹泻病的优势菌株,这说明引起腹泻病的副溶血弧菌菌株其来源具有多样性。因此,要对水源、海产品、食品等副溶血弧菌污染的多种来源渠道进行综合防制。同一时期内,上述6个地点分离的副溶血弧菌菌株大多数具有完全相同的PFGE图谱,也说明在整个地区每年都有一个主要的来源方式,存在一个主要的流行菌群导致腹泻病的暴发,这就需要在进行综合防制的同时,也要及时对分离菌株进行溯源,找到该时期的主要流行菌群及其主要来源途径,以利于切断其传播途径,加强对传染源的管理,从而更有目的地对副溶血弧菌引起的腹泻病进行预警和控制。

(感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制所阙斌研究员馈赠 *tdh+trh+* 和 *tdh-trh+* 菌株;感谢4家哨点医院对本次工作的大力支持)

#### 参 考 文 献

[1] National Standards GB/T4789.7-2003. Microbiological examination of food hygiene. State Standardization Publishing House, Beijing, 2004. (in Chinese)

国标GB/T4789.7-2003. 食品卫生微生物学检验. 北京:中国标准出版社,2004.

- [2] Davis CR, Heller LC, Peak KK. 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.
- [3] Parsons MB, Cooper KLF, 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.
- [4] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus* a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infect Immun*, 1995, 64(6):2093-2099.
- [5] Yoh M, Miwatani T, Honda T. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin (Vp-TRH) produced by environmental and clinical strains. *FEMS Microbiol. Letters*, 1992, 71(2):157-161.
- [6] Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect Immun*, 1990, 58(11):3568-3573.
- [7] Bhoopong P, Palittapongampim P, Pomwised P, et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients. *Clin Microbiol*, 2007, 5(45):1544-1550.

(收稿日期:2009-07-22)

(本文编辑:张林东)

· 更正 ·

## 本刊2009年第10期“醛固酮合成酶基因单核苷酸多态性与心房颤动的关系”一文作者单位更正

本刊2009年第10期第1069页“醛固酮合成酶基因单核苷酸多态性与心房颤动的关系”一文的作者单位应为:250012 济南,山东大学齐鲁医院临床流行病学研究室(吕明、陈兴栋、曹菲菲);山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学教研室(吕明、陈兴栋、曹菲菲);上海交通大学附属新华医院心内科(王群山);复旦大学现代人类学教育部重点实验室(金力、王笑峰、吕明、李蕾)。谨此更正。

本刊编辑部