

论著

上海市闵行区副溶血性弧菌分子流行病学特征分析

杨丽华¹,陈敏²,王小光¹,詹隆文¹,赵黎芳¹,骆玲飞¹,吴菊英¹,欧阳霖¹,宋驰萍¹,陈洪友²

(1.上海市闵行区疾病预防控制中心,上海 201101; 2.上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 分析上海市闵行区副溶血性弧菌临床和食源性分离株的分子流行病学特征,了解本地区副溶血性弧菌的流行规律。方法 对2007—2010年临床来源菌株(食物中毒患者和散发腹泻病例)以及食源性样品中分离的184株副溶血性弧菌进行血清分型、耐热直接溶血素基因(*tdh*)和耐热相关溶血素基因(*trh*)检测。对102株临床来源 O3:K6 型菌株及41株食源性样品来源株,应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行分子分型和溯源分析。结果 在调查的52起副溶血性弧菌引起的食物中毒事件中,*tdh*阳性、*trh*阴性的 O3:K6 血清型引起的有46起(88.5%),*tdh*阳性、*trh*阴性的 O4:K8 血清型引起的有5起(9.6%)。在散发腹泻病例中,*tdh*阳性、*trh*阴性的 O3:K6、O4:K8 和 O3:KUT 菌株分别占60.3% (38/63)、19.0% (12/63)和15.9% (10/63)。41株食源性样品菌株分属9种O血清群,未见 O3:K6 和 O4:K8 血清型菌株,而且 *tdh* 和 *trh* 均为阴性。PFGE 聚类分析显示闵行区食物中毒 O3:K6 分离株中存在着遗传关系密切的优势流行克隆,散发腹泻患者 O3:K6 分离株中存在着与食物中毒优势株相同谱型,而所有食源性样品分离株与临床患者来源株亲缘关系都较远。结论 临床和食源性样品来源的副溶血性弧菌在血清分型、毒力基因和分子特征等方面存在显著差异,一大群遗传关系密切、*tdh* 阳性、*trh* 阴性的 O3:K6 血清型菌株在闵行区呈优势流行。

关键词:副溶血性弧菌;血清型;毒力基因;脉冲场凝胶电泳;同源性;食源性致病菌

中图分类号:R378.3;R181.24 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)06-0523-07

Analysis of molecular epidemiological characteristics of
Vibrio parahaemolyticus isolated in Minhang district, Shanghai

Yang Lihua, Chen Min, Wang Xiaoguang, Zhan Longwen, Zhao Lifang, Luo Lingfei, Wu Juying,

Ouyang Lin, Song Chiping, Chen Hongyou

(Minhang Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201101, China)

Abstract: **Objective** To study the molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical and foodborne isolates collected in Minhang district, and understand the epidemic regularity. **Methods** 184 *Vibrio parahaemolyticus* isolates from food-poisoning, sporadic diarrhea patients and food samples from 2007 to 2010 were serotyped. Diplex-PCR was used to detect *tdh* and *trh* gene. 102 O3:K6 strains from clinical case and 41 strains from food samples were detected by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** O3:K6 strains with *tdh* positive and *trh* negative were responsible for 88.5% (46/52) of food poisoning cases caused by *Vibrio Parahaemolyticus*, and O4:K8 strains with *tdh* positive and *trh* negative were responsible for the other 5 cases (9.6%). In 63 strains from sporadic diarrhea patients, O3:K6, O4:K8 and O3:KUT with *tdh* positive and *trh* negative were responsible for 60.3% (38/63), 19.0% (12/63) and 15.9% (10/63), respectively. 41 strains from food samples belonged to 9 serotypes except O3:K6 and O4:K8, and were both *tdh* and *trh* negative. PFGE typing showed that the dominant clone in food poisoning was among O3:K6 strains, and some strains isolated from food poisoning and sporadic diarrhea patients were the same molecular type. All strains isolated from food samples were unrelated with clinical cases. **Conclusions** There was significant difference between *Vibrio Parahaemolyticus* isolated from clinical and food samples in the serotype classification, virulence gene and molecular characteristics. A group of close related *Vibrio Parahaemolyticus* of O3:K6 strains with *tdh* positive and *trh* negative seemed to be prevailing in Minhang.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; virulent gene; PFGE; homology; foodborne pathogens

收稿日期:2012-07-05

基金项目:上海市闵行区自然科学研究课题(2008MH039)

作者简介:杨丽华 女 主任技师 研究方向为细菌性食源性疾病 E-mail:yeslh520@sina.com

通信作者:陈洪友 男 主管技师 硕士 E-mail:hychen@scdc.sh.cn

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种重要的可引起食物中毒的嗜盐性致病菌,近十多年来,在一些沿海地区,该菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒之首,达到 60% 以上^[1]。上海市闵行区的食物中毒资料显示,2004—2008 年食物中毒腹泻患者肛拭中副溶血性弧菌的检出率分别为 36.34%、31.34%、45.52%、52.8%、60.6%, 分别占历年检出阳性菌的首位,而且呈上升趋势。所以,加强对副溶血性弧菌的研究,特别是进行分子流行病学方面的特征分析,将有助于防治由副溶血性弧菌引起的食源性疾病。

本文运用脉冲场凝胶电泳技术 (PFGE), 结合血清分型和毒力基因检测,对闵行地区近年临床与食物样品来源副溶血性弧菌进行分子流行病学研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株来源

80 株食物中毒患者来源株由闵行区疾病预防控制中心 2007 年 1 月至 2010 年 5 月从 52 起食物中毒中检获;63 株散发腹泻患者来源株为同时期从本区 3 个主要腹泻监测点分离获得;41 株食物来源株由本实验室从区内各大卖场或菜场的海鱼、虾、贝类等水产品中检出,也有从家畜肉和凉拌冷菜中检获。VP06365 阳性对照株(同时具有 *tdh* 和 *trh* 基因)和 PFGE 相对分子量标准(沙门菌 *Braenderup* 血清型菌株 H9812)均由上海市疾病预防控制中心微生物实验室提供。

1.1.2 培养基和试剂

弧菌显色平板(科玛嘉上海有限公司),副溶血性弧菌 11 种 O 分型血清、9 种 K 多价及 65 种 K 单价因子血清均购自日本生研(Denka Seiken)公司。PCR 反应所需 premix Taq 酶、dNTPs、10 × buffer、DNA Marker DL2000 均购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。限制性内切酶 NotI 和 XbaI 购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa),蛋白酶 K、Tris-HCl 和 EDTA(Promega,美国),SeaKem Gold Agarose(Rockland, ME 美国),TBE Buffer(BIO-RAD 公司)。

1.1.3 仪器和耗材

高通量 PCR 仪、电泳仪(BIO-RAD,美国),浊度计(bioMerieux,法国),脉冲凝胶电泳仪(BIO-RAD Chef Mapper™,美国),凝胶成像仪(BIO-RAD Chem Doc XRS + 美国),比浊管(bioMerieux,法国),Screw-cap 试管(corning,美国)。

1.1.4 引物合成

双重 PCR 扩增 *tdh* 和 *trh* 基因,引物设计参考 Bej 等^[2]文献,由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。

表 1 副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因扩增引物序列

Table 1 Oligonucleotide primers used for PCR characterization of *tdh*, *trh* genes

引物名称	核苷酸序列	产物长度(bp)
<i>tdh</i> -L	5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTTGAC-3'	270
<i>tdh</i> -R	5'-TGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3'	
<i>trh</i> -L	5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'	486
<i>trh</i> -R	5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCC-3'	

1.2 实验方法

1.2.1 血清分型

参照卫生防疫细菌手册^[3]和 GB/T4789.7—2008《食品卫生微生物学检验-副溶血性弧菌检验》进行。

1.2.2 *tdh* 和 *trh* 毒力基因检测

模板 DNA 制备:将待检菌株 3% NaCl 营养肉汤 24 h 培养物 8 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 200 μl 裂解液,100 °C 金属浴 10 min,再 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为模板 DNA。

采用双重 PCR 扩增目的基因,PCR 反应体系与循环条件参考 Bej 等^[2]的报道并优化:总反应体系 25 μl,包括 Premix Taq 12.5 μl,*tdh* 上下游引物 10 μm 各 0.2 μl,*trh* 上下游引物 10 μm 各 0.5 μl,DEPC 水 7.1 μl,DNA 模板 4 μl。用同时具有 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的 VP06365 株作阳性对照。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min,然后 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s,35 个循环,72 °C 延长 5 min。取 5 μl PCR 产物点样在含 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中,DL2000 DNA Marker 作分子量对照,电压 100 V,电泳 40 min。紫外灯下观察结果,凡出现与阳性对照分子量相当的目的条带为阳性。

1.2.3 神奈川试验

用接种环将试验菌株的 3% NaCl 胰蛋白胨大豆琼脂 18 h 培养物点种于表面干燥的我妻氏血琼脂平板,36 °C 培养 18 h,观察溶血现象。菌落周围或下方呈半透明的 β 溶血环为阳性结果。

1.2.4 PFGE 实验

参照美国 CDC“pulse Net 副溶血性弧菌标准操作步骤”进行^[4],并优化各种技术参数建立了本实验室的副溶血性弧菌 PFGE 技术方法^[5]。挑选其中临床来源 O3:K6 血清型菌株 102 株(食物中毒 64 株、散发腹泻 38 株)和食物来源 41 株进行 PFGE 分型。基本步骤包括含菌胶块制备、裂解、洗涤、

DNA 酶切然后加样电泳。电泳条件设置为:脉冲转换时间 10 ~ 35 s,线性递增,电压 6 v/cm,脉冲角度 120°,初始电流控制在 135 ~ 145 mA 之间,电泳时间 19 h,冷凝温度 14 ℃。

1.2.5 PFGE 图像分析

使用 BioNumerics 6.0 软件对 PFGE 图谱进行识别处理,用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,相似系数(Dice)高低反应菌株间亲缘关系的远近。根据 Tenover 等^[6]提出的以 PFGE 图谱为基础揭示菌株间同源性关系的判别标准:PFGE 条带位置和数目完全相同的图谱定义为同一个型,存在一个及以上条带差别的定义为不同型。其中,有 1 ~ 3 条不同条带的菌株为同一克隆,菌株间存在非常近的亲缘关系;有 4 ~ 6 条不同条带的菌株很可能存在亲缘关系,系来源于同一型别的不同亚型;有 7 条以上不同条带的菌株为不同克隆株,菌株间不存在亲缘关系。

2 结果

2.1 血清分型

80 株食物中毒来源株共分 6 个血清型,主要集中在 O3、O4 血清群,以 O3: K6 型菌株为主,占 80.0% (64/80),其次是 O4: K8 型菌株,占 8.8% (7/80)。63 株散发腹泻来源株共分 4 个血清型,主要集中在 O3、O4 血清群,也以 O3: K6 和 O4: K8 型菌株为主,分别占 60.3% (38/63)、19.0% (12/63)。41 株食物样品来源株共分 20 个血清型,大多分布在 O1、O2 血清群,以 O1: KUT、O2: KUT 血清型为主(KUT 为抗原未分型),分别占 31.7% (13/41)和 9.8% (4/41),未检出 O3: K6 和 O4: K8 型菌株(表 2)。

2.2 神奈川试验及 *tdh*、*trh* 毒力基因检测

除了 2009 年一起食物中毒事件中,从一名食堂厨师肛拭中分离到一株携带 *tdh* 和 *trh* 2 种毒力基因的 O3: KUT 菌株外,其余 79 株食物中毒来源株和 63 株散发腹泻来源株皆携带 *tdh* 基因而不携带 *trh* 基因;41 株食物样品来源株皆不携带 *tdh*、*trh* 基因。所有临床来源株神奈川试验都为阳性,而所有食物样品来源株神奈川试验都为阴性。

2.3 PFGE 分型

共有 143 株副溶血性弧菌进行了 PFGE 实验,除 2009 年 2 株食物中毒患者来源株没有分离出清晰条带(可能是 DNA 发生降解),其余 141 株菌的基因组 DNA 皆成功分离,各菌株约分为 15 ~ 20 个可清晰识别的条带,片段分子量在 20 ~ 700 kb 之间。

表 2 2007—2010 年闵行地区临床及食物来源副溶血性弧菌血清型分布

Table 2 Serotyping of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical case and food samples collected from 2007 to 2010 in Minhang

血清分型	食物中毒		散发腹泻		食源性来源		合计	
	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)
O1: K25	2	2.5	0	0	0	0	2	1.0
O1: K32	0	0	0	0	2	4.9	2	1.0
O1: K33	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O1: K37	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O1: KV	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O1: KUT	1	1.2	3	4.8	13	31.7	17	9.2
O2: K3	0	0	0	0	2	4.9	2	1.0
O2: K28	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O2: KUT	0	0	0	0	4	9.8	4	2.2
O3: K6	64	80	38	60.3	0	0	102	55.4
O3: K45	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O3: KUT	5	6.3	10	15.9	3	7.3	18	9.8
O4: K8	7	8.8	12	19.0	0	0	19	10.3
O4: K29	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O4: K63	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O4: K68	1	1.2	0	0	0	0	1	0.5
O4: KUT	0	0	0	0	2	4.9	2	1.0
O5: KUT	0	0	0	0	2	4.9	2	1.0
O6: K18	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O6: KUT	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O8: KUT	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O10: K24	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O10: KUT	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
O11: KUT	0	0	0	0	1	2.4	1	0.5
合计	8	100	63	100	41	100	184	100

2.3.1 临床来源菌株

食物中毒来源菌株中,成功分型的 62 株 O3: K6 血清型菌株按 90% 的相似度可分出 3 个大流行群。① P7-P11 型共 17 株菌聚集为一群,有 5 个 PFGE 型,群内相似度 92.4%,各型之间不超过 3 个条带差异,为高度相关菌株,均为 2007 年食物中毒患者分离株,表明此群是 2007 年闵行地区副溶血性弧菌食物中毒的代表流行菌型。② P12-P19 共 14 株菌为一群(P15、P18 除外),有 6 个 PFGE 型,群内相似度为 90.0%,各型之间不超过 3 个条带差异,大多为 2008 年食物中毒患者分离株。③ P18、P20 共 10 株菌为一群,群内相似度为 91%,各年份都有检出。以上 3 群菌株间相似度为 88%,菌株间存有 4 ~ 5 个条带差异,分析可能为相关菌株(图 1)。

另外,还存在着 3 个小流行群:2007 年同一家庭 5 株(08791、08792、08789、08793、08790),2009 年相近时间不同地点 4 株(F12、F23、F4、F22),以及不同时间不同地点 4 株(08778、08810、F13、08779)。

63 株散发腹泻病人来源株中有 38 株属 O3: K6

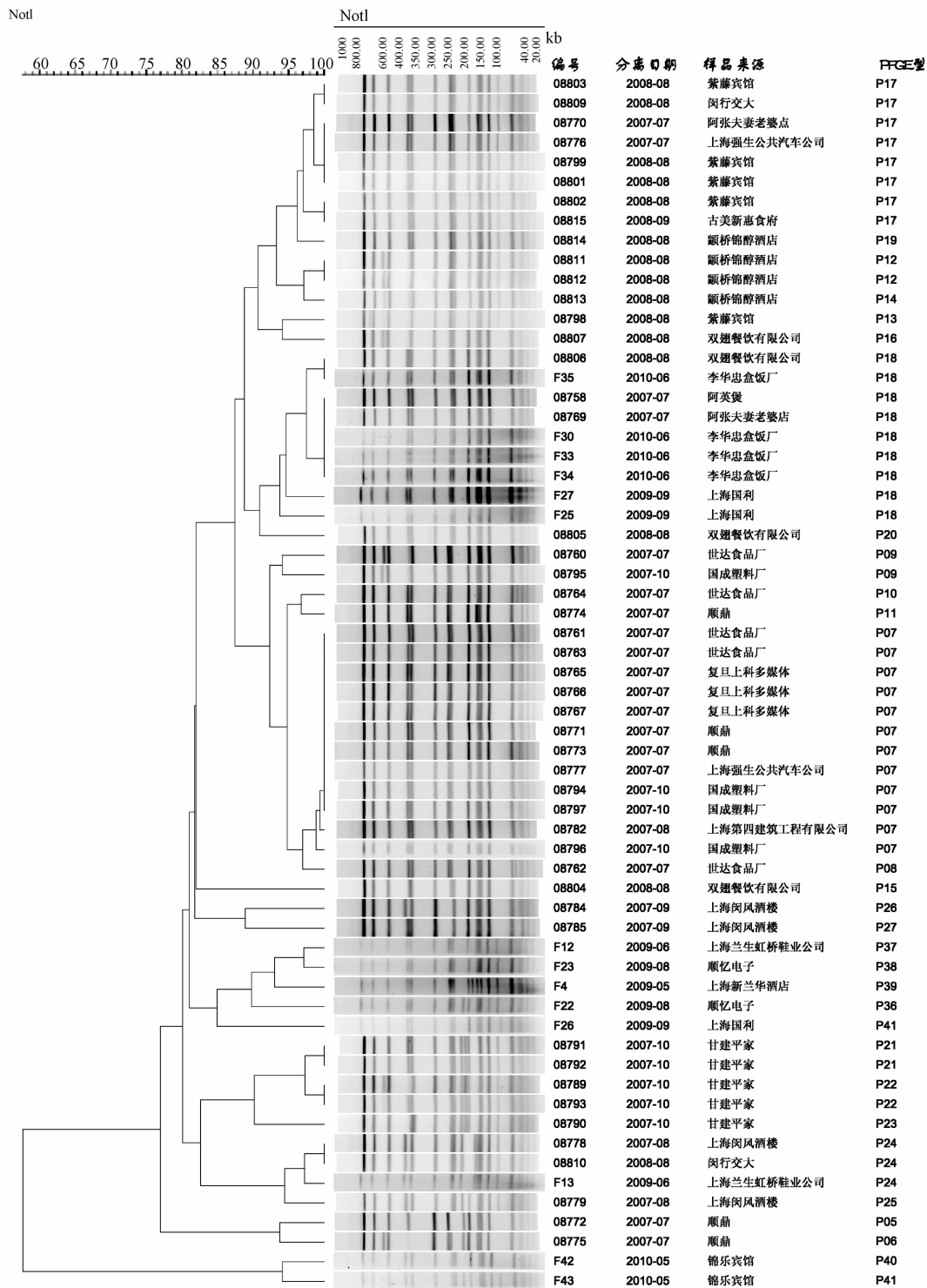


图 1 上海市闵行区食物中毒来源 O3: K6血清型副溶血性弧菌 PFGE 聚类树状图

Figure 1 PFGE patterns of *Vibrio parahaemolyticus* with O3: K6 type isolated from food poisoning in Minhang, Shanghai

血清型,与同时期食物中毒 O3: K6 优势流行株的 PFGE 图谱聚类分析显示,两种来源菌株存在着多种密切相关 PFGE 谱型(图 2)。如 M57、M7、M12 与食物中毒优势流行株 08769、08776 的相似度在 90% 以上;M32、M41、M2、M28、M47、M1 与食物中毒优势流行株 08813、F12、F23、F4 的相似度为 90%, 尽管这些菌分离自不同时间、不同地点,但以上信

息提示,本地区临床腹泻病人中存在着此型副溶血性弧菌的持续污染,从分子水平可确认其具有高度的遗传相关性。

2.3.2 食物样品来源菌株

由图 2 可见,41 株食物样品来源株的 PFGE 图谱各不相同,菌株之间均有 7 条以上条带差异,遗传相似度皆在 70% 以下,并且与同时期临床来源优势

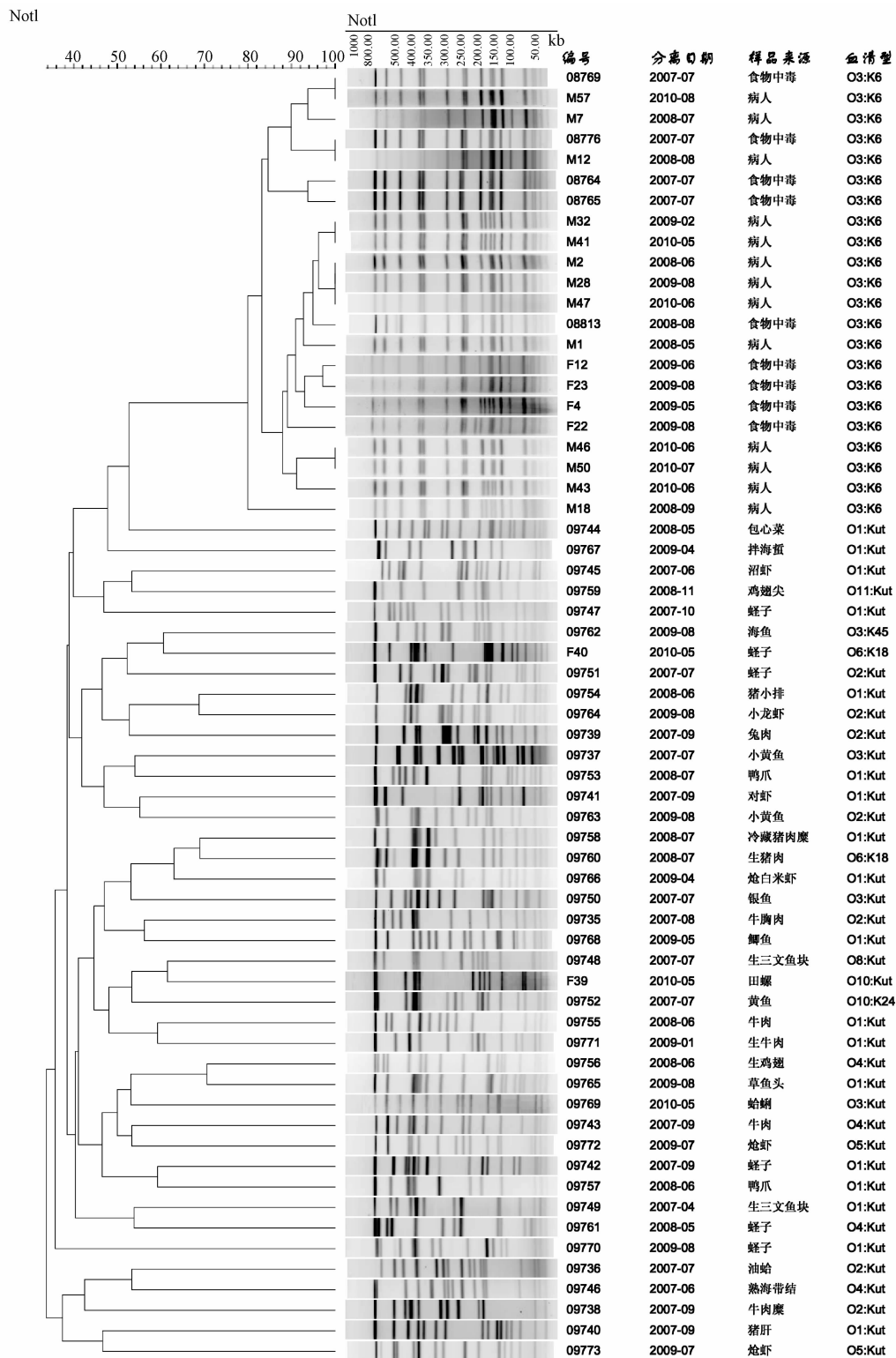


图2 上海市闵行区食物样品来源与临床来源优势副溶血性弧菌 PFGE 聚类树状图

Figure 2 PFGE patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food samples and clinical case in Minhang, Shanghai

流行株的遗传亲缘关系都较远(图2),符合前述与临床来源株在血清分型、毒力基因携带等生物学方面的诸多不同。这些食物样品采自闵行区内各地超市、菜场、宾馆、批发市场等,种类包括海产品、家畜肉类、冷菜制品等,这种遗传多样性反应了闵行地区食物样品污染的副溶血性弧菌有着广泛的来

源,是自然界中普遍存在的非致病株,并不是引起食物中毒或腹泻的直接原因。

3 讨论

通常认为,耐热直接溶血素(TDH)和耐热相关溶血素(TRH)是副溶血性弧菌的主要致病机制,分

别由 *tdh*、*trh* 毒力基因编码,能产生溶血毒素、肠毒素、细胞毒素等致病因子。TDH 可诱导副溶血性弧菌在我妻氏血琼脂上产生 β -溶血现象(即神奈川现象),中国和日本学者用 PCR 方法证实了神奈川阳性株通常携带 *tdh1* 和 *tdh2* 毒力基因,而且溶血能力与致病性成平行关系^[7]。本研究对近年闵行地区 143 株临床分离株(食物中毒 80 株、散发腹泻 63 株)以及 41 株食物样品分离株进行了血清分型及 *tdh*、*trh* 毒力基因检测,所有临床株 *tdh* 都为阳性,说明这些菌株是高度致病株,其中 102 株临床分离株(食物中毒 64 株、散发腹泻 38 株)为 O3:K6 血清型,表明闵行地区副溶血性弧菌引起的食物中毒和散发腹泻主要是由 O3:K6 血清型菌株引起。41 株食物来源株 *tdh*、*trh* 毒力基因检测均为阴性,是为非产毒株,而且食源性菌株血清型分布也与临床来源株集中在 O3、O4 抗原群的特点显著不同,大多分散分布在 O1、O2 等 9 个抗原群,并没有检出近年来常见的引起腹泻的 O3:K6 型菌株,神奈川试验也印证了上述结果,所以也有称之为“生态株”,这与国内外的文献报道基本相符^[8-9]。

虽然食源性样品等外环境中很难检出致病性菌株,但这并不意味着副溶血性弧菌不是食源性疾病发生的重要流行病学因素,而是其在外环境中存在的复杂性的一个反映。对此,笔者认为要从多方面考虑:一是所检出菌株的种类,可能现行的检验方法不适宜检测食源性样品中的副溶血性弧菌,比如食品中致病性副溶血性弧菌受各种不利因素制约存在着活的但处于不可培养状态(VBNC),从而造成漏检;二是致病性菌株在食源性样品中的生存状态发生了改变,造成毒力基因丢失。因此,在今后监测工作中,要采用更加敏感的方法如免疫磁珠富集法、改良增菌液等提高致病性副溶血性弧菌在环境中的检出率^[10-11]。

PFGE 是 80 年代发明的分析细菌大分子 DNA 片段的新技术,通过合适的稀有位点限制性内切酶进行酶切,获得菌株某亚种特有的电泳图谱,从整个基因组的角度考虑菌株间的遗传相关性。本次 PFGE 研究结果显示,在 62 株食物中毒来源 O3:K6 菌株中,聚类相似度在 88% 以上的有 41 株(66%),各菌株间存有 4~6 个条带差异,按照 Tenover 的判别标准,说明这些菌株亲缘关系比较近,应属于同一克隆。除此之外,还存在着 3 个小的流行克隆。由此可见,闵行地区食物中毒来源副溶血性弧菌的分子分型比较集中,优势型别突出。

在散发腹泻来源菌株中,存在着多种与食物中毒优势流行株相同谱型,而且大多数菌株与食物中

毒优势流行株的遗传相似度在 90% 以上。由此可见,闵行地区临床散发腹泻与食物中毒来源的副溶血性弧菌之间有着相近的分子特征。

41 株食物样品株的聚类分析显示,各菌株之间亲缘关系较远,应属于多个克隆系,提示闵行地区食源性副溶血性弧菌分离株存在广泛的遗传多样性。其与临床来源优势流行株的 PFGE 谱型差别较大,存有 7 个以上条带差异,聚类相似度都在 70% 以下,从分子水平说明这些食物样品株并非是引起食物中毒或腹泻的直接原因,这与前述血清分型和 *tdh*、*trh* 的检测情况相符,

综上所述,通过对闵行地区不同来源副溶血性弧菌分离株进行血清分型、毒力基因检测,并采用 PFGE 分子分型方法进行溯源分析,可精细区分不同来源副溶血性弧菌的分子特征以及确认各个菌株之间的相关性。引起食物中毒的副溶血性弧菌主要为 *tdh* 阳性、*trh* 阴性的 O3:K6 菌株,年度内存在 PFGE 分子分型密切相关的流行克隆。临床散发腹泻株与食物中毒株在血清型、毒力基因携带和分子分型等方面的流行特征相似,而食物样品来源株的流行特征与上述菌株有明显差异。

参考文献

- [1] 李晓春. 浙南部沿海地区细菌性食物中毒病源检测研究分析[J]. 中国预防医学杂志, 2004, 5(5): 370-373.
- [2] BEJ A K, PATTERSON D P, BRASHER C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tdh* and *trh*[J]. J Microbiol Methods, 1999, 36(3): 215-225.
- [3] 何晓青. 卫生防疫细菌检验[M]. 南昌: 新华出版社, 1989.
- [4] PARSONS M B, COOPER K L F, KUBOTA K A, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus*. Food Borne Pathogens and Disease, 2007, 4(3): 285-292.
- [5] 杨丽华, 陈敏, 王小光, 等. 副溶血性弧菌脉冲场凝胶电泳分子分型研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(6): 528-531.
- [6] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, 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.
- [7] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Duplication and variation of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Mol Microbiol, 1990, 4(1): 87-99.
- [8] 蔡潭溪, 蒋鲁岩, 黄克和. 副溶血性弧菌的分子生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(10): 914-916.
- [9] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infect Immun, 1995, 63(6): 2093-2099.
- [10] VUDDHAKUL V, SOBOON S, SUNGHIRAN W, et al. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (Meretrix

meretrix, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with food-borne disease in southern Thailand [J]. Food Prot, 2006, 69: 2615-2620.

[11] 王小英. 检测海产品中副溶血性弧菌的改良法[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(4): 256-257.

论著

食源性金黄色葡萄球菌青霉素类药物耐药基因型的分析

吕国平, 秦丽云, 王芃

(石家庄市疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 建立多重 PCR 方法检测青霉素酶基因和 *mecA* 基因, 了解食源性金黄色葡萄球菌两种 β -内酰胺类药物耐药基因的分布情况, 为金黄色葡萄球菌引起食源性疾病的防治提供参考数据。方法 建立多重 PCR 技术检测金黄色葡萄球菌青霉素酶基因、*mecA* 基因和 16S rDNA; 多重 PCR 方法测定食品来源的 171 株金黄色葡萄球菌对青霉素类药物的耐药基因型。结果 165 株菌携带有青霉素酶基因 (96.5%), 9 株菌携带有 *mecA* 基因 (5.3%)。结论 建立的多重 PCR 检测方法快速、简便、准确, 可满足高通量筛选菌株的需求; 食源性金黄色葡萄球菌具有很高的青霉素酶基因携带率, 并存在耐甲氧西林的菌株。

关键词: 金黄色葡萄球菌; β -内酰胺类药物; 青霉素酶基因; *mecA* 基因; 16S rDNA; 食源性致病菌; 耐青霉素敏感基因

中图分类号: R378.11 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)06-0529-04

Genotype analysis of penicillins-resistance in foodborne *Staphylococcus aureus*

Lü Guoping, Qin Liyun, Wang Xian

(Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Hebei Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: Objective To establish a multiplex PCR method to detect penicillinase gene, *mecA* gene and 16S rDNA simultaneously, and investigate the distribution of penicillinase gene, a kind of choloylglycine hydrolase, and *mecA* gene in foodborne *Staphylococcus aureus* strains. **Methods** The multiplex PCR method was established to detect penicillinase gene, *mecA* gene and 16S rDNA. **Results** 165 strains were detected penicillinase gene with overall positive rate 96.5%, while 9 strains were detected both *mecA* gene and penicillinase gene with overall positive rate 5.3%. **Conclusion** The multiplex PCR method which was rapid, convenient and precise, could be used for high throughput screening of penicillinase gene, *mecA* gene and 16S rDNA. Most strains of foodborne *Staphylococcus aureus* carry penicillinase gene, and a few of them are methicillin resistant.

Key words: *Staphylococcus aureus*; penicillins; penicillinase gene; *mecA* gene; 16S rDNA; foodborne pathogens; penicillins-resistance

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是人类外伤感染中最常见的病原菌, 也是引起食物中毒的常见食源性致病菌, 青霉素类药物的作用主要是抑制革兰阳性菌细胞壁的合成, 自从青霉素问世后, 金黄色葡萄球菌相关疾病的治疗得到了极大改善, 随着青霉素的广泛大量使用, 产青霉素酶的菌株悄然出现并迅速蔓延; 后来人类又发明了耐青霉素酶

的甲氧西林和苯唑西林, 随后又出现了耐甲氧西林、耐苯唑西林的金黄色葡萄球菌菌株^[1-2]。金黄色葡萄球菌携带青霉素酶基因和 *mecA* 基因, 是对青霉素类药物产生耐药的主要原因^[3-4]。

本研究建立了三重 PCR 快速检测体系, 能够同时扩增两个耐药基因 *mecA* 基因、青霉素酶基因和一个内参照基因 16S rDNA。通过检测 *mecA* 基因和青霉素酶基因的分布状况, 在基因型上评价食源性金黄色葡萄球菌对青霉素类药物的耐药状况, 为探究金黄色葡萄球菌的耐药现状提供科学数据。

收稿日期: 2012-07-11

作者简介: 吕国平 女 主管检验师 研究方向为卫生微生物

E-mail: lvguoping116@163.com