

- 基因型分布研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(5): 427-429.
- [5] Maiden M C, Bygraves J A, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(6): 3140-3145.
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 10—2010 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [7] Enright M C, Day N P, Davies C E, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Microbiol, 2000, 38(3): 1008-1015.
- [8] David A. Multi locus sequence typing[DB/OL]. Imperial College London: Wellcome Trust. 2007 (2014-07-15) [2014-07-20]. <http://saureus.mlst.net/>.
- [9] 张严俊, 王志刚, 程苏云, 等. 金黄色葡萄球菌食品和病人分离株肠毒素基因和耐药性比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 33-35.
- [10] 张俊彦, 张严峻, 朱敏, 等. 金黄色葡萄球菌食品分离株肠毒素基因型分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(6): 1417-1418.
- [11] 章乐怡, 李毅, 马雪莲. 食物中毒及食品中金黄色葡萄球菌的肠毒素及基因的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(12): 2851-2853.
- [12] 沈伟伟, 裘丹红, 徐佳, 等. 台州市食源性金黄色葡萄球菌的主动监测及肠毒素基因分布研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(11): 2674-2676.
- [13] Akineden O, Annemüller C, Hassan A A, et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001, 8(5): 959-964.
- [14] 王丽, 王冰, 黎桂莲, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素快速分型体系的建立及应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(2): 154-156.

论著

基于 *tdh1* 基因变异的大流行副溶血性弧菌鉴别方法的建立

陈洪友, 屠丽红, 宋元君, 陈敏, 张曦
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

摘要:目的 基于副溶血性弧菌 *tdh1* DNA 序列中特异性变异位点, 建立新的大流行株鉴别方法。方法 通过对多种型别菌株的 *tdh* 序列进行比对, 查找大流行株特异性变异位点, 并基于该位点设计位点特异性 PCR 体系和检测方法。以 GS-PCR 和 *tdh* 基因联合检测为参照方法, 用已知大流行株、非大流行株和 2014 年收集的 1 067 株副溶血性弧菌对新方法进行验证。结果 3 株菌株的 6 条 *tdh* 全序列存在 26 个多态性位点, 其中 *tdh1* 基因的第 368 位碱基的变异[G/A]能用于鉴别大流行株, 本研究基于此位点建立了 *tdh1*_368 位点特异性 PCR。该变异能将 1996 年后的大流行 O3:K6 型菌株与 1996 前的进行区分, 也能将大流行株其他血清型变种与非流行菌株进行区分。对 2014 年的 1 067 株菌株的检测结果显示, *tdh1*_368 位点特异性 PCR 与参考方法检测结果完全一致。结论 本研究以副溶血性弧菌 *tdh* 基因的多态性位点建立检测大流行菌型的试验方法, 从对 1 067 株菌株的实测结果来看, *tdh1*_368 位点特异性 PCR 与既往报道的方法具有高度的一致性, 且指标更为直接。

关键词: 副溶血性弧菌; *tdh*; PCR; 食源性致病菌; 鉴别方法

中图分类号: R155.5; R378.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)04-0353-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.002

An allele-specific PCR for identifying *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains based on *tdh1* mutation

CHEN Hong-you, TU Li-hong, SONG Yuan-jun, CHEN Min, ZHANG Xi

(Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective The aim of this research was to establish a novel method based on *tdh1* gene variation for identifying *V. parahaemolyticus* pandemic strains. **Methods** *tdh* sequences from various strains were compared, and specific sites for pandemic strains were searched. Allele-specific PCR was established based on the selected site, and verified by known isolates and isolates from 2014, compared with the joint of GS-PCR and *tdh* method as a reference methods. **Results** 26 sites in 6 *tdh* sequences from 3 isolates showed polymorphism, and only the 368th base could be

收稿日期: 2015-05-18

基金项目: 国家“十二五”科技国家科技重大专项(2013ZX10004216-001-004)

作者简介: 陈洪友 男 主管医师 研究方向为致病性弧菌检测 E-mail: chenhongyou@scdc.sh.cn

通讯作者: 陈敏 男 主任技师 研究方向为病原微生物的实验室检测 E-mail: chenmin@scdc.sh.cn

used to identify pandemic strains. *tdh1_368* allele-specific PCR was based on this site which could discriminate pandemic O3 : K6 strains before and after 1996. This method could also discriminate other serovariants of pandemic strains from non-pandemic strains. According to the detection of 1 067 isolates from 2014, complete consistent was showed between the novel method and the reference method. **Conclusion** *tdh1_368* allele-specific PCR was useful for *V. parahaemolyticus* pandemic strains identification, and the detection target was more simple and direct compared with the methods reported. It was the first time to use this mutation for pandemic strains identification.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *tdh*; PCR; food-borne pathogenic bacteria; identification method

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 最初发现于 1950 年的一起食物中毒事件, 尽管多种血清型的 VP 能致人感染, 但 1996 年之后出现的 O3: K6 型及其血清型变种被认为是导致世界范围内 VP 腹泻暴发和流行的主导菌型^[1-3]。

众多研究者对大流行株的鉴别进行了大量的工作, Matsumoto 等^[4] 根据 *toxR-S* 序列的特异性位点建立了群特异性 PCR (group specific PCR, GS-PCR) 用于鉴别大流行株, 基于此方法研究人员陆续又发现大流行株的其他血清型变种^[2,4]。有学者在 O3: K6 型大流行株中分离到带有特殊开放式阅读框 (8th open reading frame, *orf8*) 的丝状噬菌体 f237, 研究表明 *orf8* 对鉴别流行株具有一定价值^[1]。但 Okura、Vongxay、Bhuiyan、Jones 等^[5-8] 的研究表明存在 GS-PCR 阳性的非流行株, 且也有不携带 f237 噬菌体及其 *orf8* 片段的大流行株。基于上述发现, Okura 等^[5] 在 GS-PCR 基础上考虑了耐热直接溶血素基因 (*tdh*) 建立了一套双重 PCR 体系用于识别流行株并被广泛应用^[5,9]。该方法用于菌株的大流行株鉴别效果明显。

但由于样品中常常存在多种菌型的副溶血性弧菌^[10], 并且 GS-PCR 或 *tdh* 分别阳性的菌株可同

时存在于同一样品中, 因此既往方法并不能直接用于估计原始样品中有无流行株及其相应的比例。*tdh* 是 VP 的一个重要的毒力基因^[11], 此次研究将基于 *tdh* 序列的变异, 建立依靠单一指标检测流行株的新方法, 以期可直接用于检测原始样品, 如食品、粪便等样品中大流行株的有无。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

VP 菌株均为上海市疾病预防控制中心收集和保存。其中 18 株临床腹泻病人分离株用于位点特异性 PCR 体系的构建与验证, 见表 1。大流行株的判断参照文献[5], 即 *tdh* 与 GS-PCR 同时阳性。另外分离于 2014 年的 1 067 株菌株用于体系的实际测试, 其中临床腹泻病人分离株 992 株 (含 46 株食物中毒分离株), 食品分离株 73 株, 环节样品分离株 2 株 (分别来自砧板和苍蝇)。所有菌株均以含 15% 甘油的脑心浸液肉汤保存于 -80 °C, 菌株复苏首先接种 TCBS 平板并置 37 °C 培养 24 h, 挑选绿色菌落接种含 3% NaCl 的营养琼脂平板于 37 °C 传代 2 次, 培养物用于菌株 DNA 的提取。

表 1 用于验证 *tdh1_368* 位点特异性 PCR 的菌株及其特征

Table 1 Strains and the characteristic for verification of *tdh1_368* allele-specific PCR

序号	菌株	分离年代	地区	血清型	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	GS-PCR	流行株
1	229-91	1991	上海卢湾	O3: K6	-	-	+	否
2	AQ 4037	1985	日本	O3: K6	-	+	-	否
3	42-88	1987	辽宁营口	O3: K6	-	+	-	否
4	127-96	1996	上海卢湾	O3: K6	+	-	+	是
5	肛 88	2012	上海浦东	O3: K6	+	-	+	是
6	03959/3	2012	上海闵行	O3: K6	+	-	+	是
7	F542	2011	上海嘉定	O10: K60	+	-	+	是
8	F346	2012	上海嘉定	O1: K36	+	-	+	是
9	1717 多	2012	上海黄浦	O1: K25	+	-	+	是
10	1200154	2012	上海普陀	O1: KUT	+	-	+	是
11	qpvp120023	2012	上海青浦	O3: KUT	+	-	+	是
12	1201412	2012	上海普陀	O4: K68	+	-	+	是
13	163-86	1986	上海虹口	O1: K25	+	-	-	否
14	虹 353	1983	上海虹口	O4: K8	+	-	-	否
15	828-1	2012	上海崇明	O4: K9	+	-	-	否
16	肠 1120	2011	上海嘉定	O4: K12	+	+	-	否
17	PD417	2012	上海浦东	O3: K29	+	-	-	否
18	F270	2011	上海嘉定	O1: K33	-	-	-	否

1.1.2 主要仪器与试剂

C1000 核酸扩增热循环仪(美国 Bio-Rad), Multi Sub 核酸电泳仪(英国 Cleaver)。TaKaRa Premix Taq™ 聚合酶链式反应预混液、核酸电泳琼脂糖、50 bp DNA 分子量梯度标记均购自大连宝生物, TCBS 琼脂平板、3% NaCl 的营养琼脂平板均购自中国腹泻病试剂供应中心(上海), 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 乙二胺四乙酸(EDTA)。

1.2 方法

1.2.1 核酸抽提

取新鲜含 3% NaCl 的营养琼脂培养物以

500 μl TE 缓冲液(10 mmol/L Tris : 1 mmol/L EDTA, pH = 8.0) 制成药 1 个麦氏浊度单位的均匀菌悬液, 置 100 °C 加热 10 min, 12 000 g 离心 15 min, 取上清以 TE 做 10 倍稀释作为 PCR 的 DNA 模板。

1.2.2 PCR 引物

本研究共使用 5 对 PCR 引物, 引物对 *tdh*、*trh* 用于检测菌株是否具有 *tdh* 或 *trh* 基因, GS-PCR 用于检测菌株 *toxR-S* 序列中是否具有大流行株相关变异, *orf8* 用于确认菌株是否携带 f237 噬菌体, 此 4 对引物引自相关文献, 见表 2。

表 2 PCR 引物及其使用参数

Table 2 Primer pairs and their parameters used in this study

引物	序列(5'-3')	预期产物 /bp	终浓度 / (nmol/L)	退火温度 /°C	参考文献
<i>tdh</i>	F:GTAAAGGCTCTGACTTTTGGAC	270	200	52	[12]
	R:TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC				
<i>trh</i>	F:TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	486	400	52	[12]
	R:CATAACAAACATATGCCCATTTCC				
<i>toxR-S</i> ^a	F:TAATGAGGTAGAAACA	651	300	45	[4]
	R:ACGTAACGGGCTACA				
<i>orf8</i>	F:GTTCGCATACAGTTGAGG	746	200	52	[5]
	R:AAGTACAGCAGGACTGAG				
<i>tdh1_368</i>	F:GTCATTCTGCTGTCTCGTAAATCGTG ^b	208	200	62	本研究
	R:AAAAACGATTCCTTGTGGATATACACATTACCAA				

注: a: *toxR-S* 为 GS-PCR 引物; b: 3'端为流行株特异性碱基, 3'端第 2、3 碱基(黑体)为错配碱基

tdh1_368 位点特异性引物为本研究新设计。引物设计所使用的参考序列为 NCBI GeneBank 中的 6 条 *tdh* 序列, 分别为 GI: 28899855 (大流行株 RIMD2210633 的全基因组序列, 取 *tdh1*、*tdh2* 序列)、GI: 217196 (*tdh1*, 非流行株 T4750)、GI: 217192 (*tdh2*, 非流行株 T4750)、GI: 48480 (*tdh3*, 非流行株 AQ3776)、GI: 48482 (*tdh4*, 非流行株 AQ3776)。经比对长 570 bp 的 *tdh* 全序列中, 6 条序列间存在 26 个位点的差异。差异位点大多反应的是不同 *tdh* 型之间的差异, 仅第 368 位碱基 [G/A] 变异能将大流行株和非流行株区分, 见图 1。参照文献 [13-14] 使用 Primer 3 进行位点特异性 PCR 引物设计。为提高 PCR 特异性, 在上游引物的 3'端第 2、3 个碱基(第 366 [G/A]、367 [T/G] 位碱基)人为引入错配碱基, 下游引物为 *tdh* 共有序列。PCR 引物由上海生工合成, 以 TE 缓冲液稀释成 10 μmol/L 的使用浓度。

1.2.3 目标序列的 PCR 扩增与检测

GS-PCR 和 *tdh* 用于确认菌株是否为大流行株, 两者均阳性的为大流行株, 否则为非流行株, 以此为“金标准”来验证 *tdh1_368* 位点特异性 PCR 及 *orf8* 的特异性和灵敏度。

5 对引物分开进行 PCR 反应。PCR 体系总体

积为 25 μl, 其中 PCR 预混液 12.5 μl, DNA 模版 1.5 μl, 按终浓度加入相应体积各引物, 以灭菌去离子水补足体系至 25 μl。PCR 体系在热循环仪中 95 °C 维持 3 min, 继以热循环 25 次(95 °C 变性 30 s; 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min), 最终 72 °C 延伸 5 min, 12 °C 维持至产物检测, 各对引物退火温度见表 2。取 PCR 产物 5 μl 加于 1% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.1 μg/ml) 中, 电泳缓冲液为 0.5 × TBE, 电压为 6 V/cm。电泳 30 min 后将凝胶置紫外灯下成相。

2 结果

2.1 大流行株 *tdh* 特异性位点的数据库查询

经比对 570 bp 的 *tdh* 全序列中, 6 条序列间存在 26 个位点的差异。差异位点中大多反应的是不同 *tdh* 型之间的差异, 仅第 368 位碱基 [G/A] 变异能将大流行株和非流行株区分, 见图 1。

以菌株 RIMD2210633 的 *tdh1* 序列为提交序列, 利用序列基本局部比对搜索工具(basic local alignment search tool, BLAST)对 NCBI 核酸数据库进行比对搜索。在含有 368 位点的副溶血性弧菌 *tdh* 序列中, 有 12 条序列的第 368 位点为 G, 与大流行株 *tdh1* 序列相同, 其中非流行株 WP1 (1968 年分离

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
RIMD2210633tdh1 ATGAACACCAATATTTTGCAAAAAATGATTTTTATTATATCCATGTTGGCTGCATTCAAAACATCTGCTTTTGAGCTCCATCTGTCCCTTTTCCTG
RIMD2210633tdh2 .....GT...G.....T...C.....
T4750      tdh1 .....G.....T...C.....
T4750      tdh2 .....GT...G.....T...C.....
AQ3776      tdh3 .....GT...G.....T...C.....
AQ3776      tdh4 .....GT...G.....T...C.....

101     110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CCCCCGGTTCTGATGAGATATTGTTGTTGTTGTCGAGATACAACATTTTAAATACCCAAGCTCCGGTCAATGAAAGGTCTCTGACTTTTGGACAAACCGTAA
.....A.T..A.....G.....
.....A.T..A.....G.....
.....G.....A.T..A.....
.....A.T..A.....

201     210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TGTA AAAAGAAAACCGTACGAAAGATGTTTATGGTCAATCAGTATTCAACAACGTGAGTAACTAAATGGTTGACATCCTACATGACTGTGAACATTAATGAT
.....A.....C.....
.....A.....C.....
.....A.....C.....
.....A.....C.....

301     310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AAAGACTATACAATGGCAGCGGTGTCTGGCTATAAGAGCGGTCATTCTGCTGTGTTTCGTA AAAATCAGGTC AAGTACAACCTCAACATTCTATAATCTG
.....CA.....G.....G.....
.....A.....A.....
.....CA.....A.....G.....
.....C.....A.....G.....
.....A.....A.....G.....

401     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
TAGCTAACTTTTGGTGAAGATGAAGGTTCTATTCCAAGTAAAATGTATTGGATGAAACTCCAGAATATTTTGTAAATGATAGAAGCATATGAGAGTGG
.....A.....
.....G.....A.....A.....A.....A.....
.....A.....A.....G.....

501     510     520     530     540     550     560     570
TAGTGGTAATATATGGTAATGTGTATATCCAACAAAAGAAATCGTTTTTGAATGTAACATCAACAATAA
.....G.....A.....
.....T.....A.T.....

```

注:参照序列为 RIMD2210633 *tdh1* (第一行),其他 5 条序列各位点如与参照序列碱基相同以 . 表示,不同则直接以相应碱基表示;
 ^ 表示人为引入错配碱基;→与←表示扩增延伸方向

图 1 *tdh* 基因碱基多态性及 *tdh1*_368 位点特异性 PCR 引物的设计

Figure 1 Polymorphism of *tdh* and primers designed of *tdh1*_368 allele-specific PCR

于日本,血清型 O4: K12),其 *tdh1* 序列(GI:48477) 在 368 位点变异同流行株。

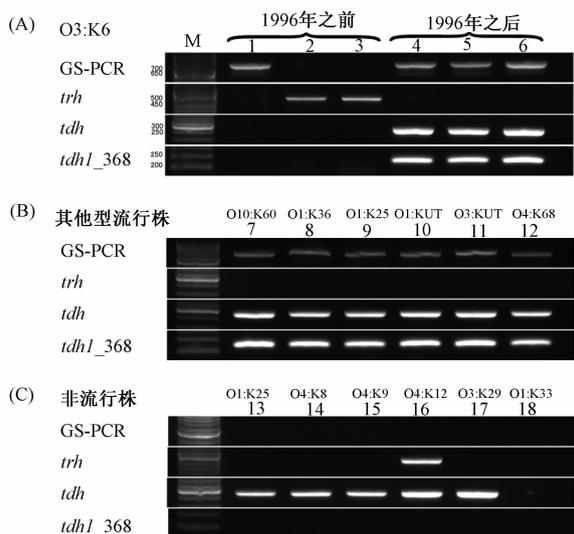
2.2 *tdh1*_368 位点特异性 PCR 的验证

验证菌株 1~6 中,3 株 1996 年前的 O3: K6 型 VP 通过 GS-PCR 和 *tdh* 基因的联合检测,结果显示均为非流行株,包括 1 株 GS-PCR 阳性和 2 株 *trh* 阳性但 *tdh* 均阴性的 VP。3 株 1996 年之后的 O3: K6 菌株均为流行株。*tdh1*_368 位点特异 PCR 检测结果与“金标准”相同,见图 2-A。验证菌株 7~12 是 6 株 O3: K6 之外的大流行株血清型变种,包括 O4: K68、O1: K25、O1: K36、O3: KUT、O10: K60、O1: KUT 血清型 VP 各 1 株,*tdh1*_368 位点特异 PCR 检测结果与 GS-PCR 和 *tdh* 联合检测结果一致,即均为大流行株,见图 2-B。验证菌株 13~18 是上海地区常见的 6 个非流行株,1 株 *tdh* 和 *trh* 阳性,4 株仅 *tdh* 阳性,1 株 *tdh* 和 *trh* 均阴性。此 6 株 GS-PCR 全阴性,*tdh1*_368 位点特异 PCR 检测结果也全阴性,见图 2-C。

2.3 2014 年菌株检测结果

使用 *tdh*、*trh* 引物对 2014 年收集的 1 067 株副溶血性弧菌进行相关 PCR 的检测。所有菌株中仅 *tdh* 阳性菌株占 81.8% (873/1 067),*tdh* 和 *trh* 同时阳性菌株占 3.2% (34/1 067),仅 *trh* 阳性菌株占 1.3% (14/1 067),见表 3。

GS-PCR 和 *tdh* 联合检测结果显示 56.8% (606/1 067) 的菌株为流行株,表明携带 *trh* 的菌株均不是流行株,包括 *tdh* 和 *trh* 同时阳性的菌株。*tdh1*_368 特异性 PCR 检测结果与 GS-PCR 和 *tdh* 联合检测结果一致(配对卡方检验 $P = 1$),*orf8* 则与 GS-PCR 和 *tdh* 联合检测结果存在差异,且该差异有统计学意义(配对卡方检验 $P < 0.01$)。尽管以 GS-PCR 和 *tdh* 联合检测为“金标准”,*tdh1*_368 位点特异性 PCR 与 *orf8* 对于判断菌株是否为大流行株的特异度均为 100%,但 *tdh1*_368 位点特异性 PCR 检测的灵敏度为 100%,要高于 *orf8* (86.5%)。



注:A为O3:K6型菌株;B为O3:K6之外其他血清型流行株;C为非流行株各血清型菌株;泳道的序号同表1中菌株的序号

图2 *tdh1_368* 位点特异性 PCR 与“金标准”的对 18 株菌株的检测对比

Figure 2 Results of *tdh1_368* allele-specific PCR compared with “Gold Standard”

表3 *tdh1_368* 位点特异性 PCR、*orf8* 和“金标准”对 1 067 株菌株的检测比较(株)

Table 3 Difference between *tdh1_368* allele-specific PCR and *orf8* in 1 067 isolates compared with “Gold Standard”

对比方法	金标准	GS-PCR +		GS-PCR -			合计
		<i>tdh</i> + <i>trh</i> -	<i>tdh</i> + <i>trh</i> +	<i>tdh</i> + <i>trh</i> -	<i>tdh</i> - <i>trh</i> +	<i>tdh</i> - <i>trh</i> -	
<i>tdh1_368</i>	+	606	0	0	0	0	606
	-	0	34	267	14	146	461
<i>orf8</i>	+	524	0	0	0	0	524
	-	82	34	267	14	146	543

注: + 为结果阳性, - 为结果阴性

3 讨论

副溶血性弧菌是一种自然栖生菌,在咸水环境中具有广泛的分布。副溶血性弧菌 O3:K6 型大流行菌株自 1996 年被发现之后,迅速蔓延至世界各地,相继出现了数十个其他血清型变种,据相关数据显示副溶血性弧菌引起的腹泻约有 50% 以上归因于大流行株^[9,15-17]。作为分布最为广泛的一种 VP 菌型,其来源自发现之日起即被广泛讨论。

针对 VP 大流行株的感染源的探讨和控制,疾病预防控制工作中需要对食品中是否存在大流行株进行判断。Okura 等^[5]建立的双重 PCR 体系,通过对菌株进行 *tdh* 和 GS-PCR 的检测以确定菌株是否为大流行株,该方法被国际上众多研究者所承认和采用,可以将其视为大流行株判别的“金标准”。但是因为“金标准”需要对 *toxR-S* 变异和 *tdh* 两个独立的位点进行检测,且由于 *toxR-S* 变异和 *tdh* 基因可单独存在的情况,因此“金标准”无法确定食品中是否含有大

流行株^[18]。此次研究建立的 *tdh1_368* 位点特异性 PCR 对大流行株的鉴别是基于单个指标,能避免“金标准”对食品样品进行直接检测的缺陷,因此可以用来直接评估原始样品是否含有大流行株。

通过对上海地区最为常见的大流行株及其变种^[15,19](血清型为 O3:K6、O4:K68、O1:K25、O1:K36、O3:KUT、O10:K60、O1:KUT)和前 3 位的非流行菌株(血清型为 O4:K8、O4:K9、O3:K29)的验证,以及对 2014 年的 1 067 株 VP 菌株的实际检测,结果显示 *tdh1_368* 位点特异性 PCR 与“金标准”检测结果完全一致。并且相对于其他方法,如 *orf8*,具有更高的灵敏度。

此次验证和实际检测所使用的菌株以临床腹泻病人分离株为主,仅有约 6.8% 为食品株,另外由于食品中 VP 的构成十分复杂,因此并不能排除自然环境中具有相同变异的非流行菌株的存在。事实上使用 BLAST 在 NCBI 核酸数据库中对 *tdh1* 序列进行比对搜索显示,非流行株 WP1(O4:K12)的 *tdh1* 序列(GI:48477)在 368 位点存在与大流行株相同的变异。但此次研究中选用的 O4:K12 型地方株(肠 1120)在 *tdh1* 的 368 位点并不能检测到相应的变异,推测具有相同变异的 O4:K12 型菌株在引起腹泻的 VP 种群中的比例可能较低。因此作为检测食品中是否含有大流行株的方法,尚需大量食品株的进一步验证,这是此次研究的缺陷之一。此外由于 *tdh1* 和 *tdh2* 基因在序列上高度相似,为了提高 *tdh1_368* 位点特异性 PCR 的特异性,在 PCR 引物的 3' 端第 2、3 位人为引入了错配碱基,错配碱基的存在提高 PCR 特异性的同时会导致 PCR 扩增效率一定程度的下降,因此当样品中大流行株数量过少时,可能会导致假阴性的出现。

总之,众多学者提出了多种方法用于大流行株的鉴别,各有优、缺点^[18],但利用 *tdh1* 序列第 368 位碱基变异来建立流行株的判别方法在国内、外尚未见报道。基于此位点,对试验条件进行相应优化,可将其改进为实时荧光 PCR,不仅可对大流行株进行定性检测还使对样品中的大流行株的定量成为可能。

参考文献

- [1] Ceccarelli D, Hasan N A, Huq A, et al. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3:97.
- [2] Nair G B, Ramamurthy T, Bhattacharya S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1):39-48.
- [3] Newton A, Kendall M, Vugia D J, et al. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996-2010: review of surveillance data from 2 systems[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(Suppl 5):

- 391-395.
- [4] 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]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (2) : 578-585.
- [5] 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.
- [6] Vongxay K, WANG S N, ZHANG X F, et al. Pathogenic characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical and seafood sources [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126 (1/2) : 71-75.
- [7] Bhuiyan N A, 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.
- [8] Jones J L, Ludeke C H, Bowers J C, et al. Biochemical, serological, and virulence characterization of clinical and oyster *Vibrio parahaemolyticus* isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50 (7) : 2343-2352.
- [9] Velazquez-Roman J, Leon-Sicairos N, Flores-Villasenor H, et al. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78 (6) : 1794-1803.
- [10] 陈洪友, 屠丽红, 陈敏, 等. 贝类水产中副溶血性弧菌菌型分布研究 [J]. *疾病监测*, 2014, 29 (7) : 522-527.
- [11] Broberg C A, Calder T J, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants [J]. *Microbes Infect*, 2011, 13 (12/13) : 992-1001.
- [12] 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 *tl*, *tdh* and *trh* [J]. *J Microbiol Methods*, 1999, 36 (3) : 215-225.
- [13] LIU J, HUANG S M, SUN M Y, et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application [J]. *Plant Methods*, 2012, 8 (1) : 34.
- [14] YE J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13 : 134.
- [15] 陈洪友, 盛跃颖, 屠丽红, 等. 2012年上海地区副溶血性弧菌血清分型和毒力基因携带状况研究 [J]. *微生物与感染*, 2014, 9 (1) : 37-42.
- [16] 翁琴云, 张建梅, 朱滢, 等. 2005—2011年厦门市食物中毒副溶血性弧菌的病原特征分析 [J]. *中国当代医药*, 2014, 21 (19) : 4-8.
- [17] 李宇聪, 杨丽, 方昌勇, 等. 东莞市不同来源副溶血性弧菌的病原学特征分析 [J]. *华南预防医学*, 2014, 40 (5) : 440-444.
- [18] Pendru R. Genetic markers of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*: are they truly unique? [J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2011, 8 (5) : 653-654.
- [19] 陈洪友, 盛跃颖, 宋元君, 等. 上海地区副溶血性弧菌大流行菌株血清型及分子特征研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26 (1) : 5-9.

论著

石家庄市 131 株食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因的分布

秦丽云¹, 吕国平¹, 蔡箴¹, 潘琢¹, 齐丽荣²

(1. 石家庄市疾病预防控制中心, 河北 石家庄 050011;

2. 白求恩医务士官学校, 河北 石家庄 050081)

摘要:目的 研究石家庄市食源性蜡样芽胞杆菌毒力基因的分布及毒力活性, 了解蜡样芽胞杆菌的潜在威胁。方法 采用 PCR 方法, 对食品风险监测中分离到的 131 株蜡样芽胞杆菌进行肠毒素、呕吐毒素 9 种毒力基因扩增检测, 用血平板检测的方法分析蜡样芽胞杆菌的毒力。结果 毒力基因携带率较高, 至少携带一个毒力基因的菌株达到检出菌总数的 99.2% (130/131), 溶血素 BL 基因 (*hblACD*) 和肠毒素 FM 基因 (*entFM*) 是石家庄市食源性蜡样芽胞杆菌的主要毒力基因; 检出的蜡样芽胞杆菌均产生溶血素 BL, 检出率为 100%。结论 腹泻型肠毒素在食品中的分布比较广泛, 检出的蜡样芽胞杆菌均具有溶血素, 对进食者存在潜在的危险性, 今后应加强监控蜡样芽胞杆菌的污染, 预防和控制蜡样芽胞杆菌食源性疾病的发生。

关键词:食源性致病菌; 蜡样芽胞杆菌; 肠毒素; 呕吐毒素; 毒力基因; 溶血素 BL; 风险监测; 石家庄

中图分类号: R155.5; S852.61⁺6 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)04-0358-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.003