

## 研究报告

## 一起副溶血性弧菌食物中毒分离株的特征分析

张晶,王安娜,陶霞,周勇,张欣强,白志军

(广州市疾病预防控制中心微生物检验科,广东广州 510440)

**摘要:**目的 分析2017年广州市一起副溶血性弧菌食物中毒分离株的特征。方法 采用血清型鉴定,药敏实验,毒力基因(*tdh*、*trh*、*tlh*)、*toxRS/new*基因、*orf8*基因的聚合酶链式反应(PCR)检测,脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点序列分型(MLST)进行分析。结果 14株副溶血性弧菌血清型鉴定为O8:K21,药敏试验显示14株菌对氨苄西林、甲氧苄氨嘧啶耐药,对头孢曲松、环丙沙星、氯霉素、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺复合物、阿米卡星、茶啶酸、链霉素、四环素、庆大霉素敏感。毒力基因全部为*tdh+tlh+trh-*,均携带*toxRS/new*和*orf8*基因。经PFGE聚类分析,14株判断为高度相关株。经MLST分析,结果全部为ST479型。结论 引起此次食物中毒的病原菌是副溶血性弧菌O8:K21型,彼此具有共同的遗传特征,携带大流行克隆株的标志性基因,应进一步加强对此类菌株的监测和控制。

**关键词:**副溶血性弧菌; O8:K21; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳; 多位点序列分型

中图分类号:R378 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)03-0256-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.03.002

### Etiological analysis of a small outbreak of gastroenteritis with *Vibrio parahaemolyticus* infection

ZHANG Jing, WANG Anna, TAO Xia, ZHOU Yong, ZHANG Xinqiang, BAI Zhijun

(Guangzhou Center for Diseases Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510440, China)

**Abstract: Objective** To investigate the etiology of a small outbreak of gastroenteritis caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Guangzhou, 2017. **Methods** Serotype identification, antimicrobial susceptibility test, polymerase chain reaction (PCR) test of virulence genes (*tdh*, *trh*, *tlh*), *toxRS/new* gene, *orf8* gene, pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) were analyzed. **Results** The serotype O8 : K21 was identified. All isolates were sensitive to ceftriaxone, ciprofloxacin, chloramphenicol, cotrimoxazole, sulfonamide complex, amikacin, nalidixic acid, streptomycin, tetracycline and gentamicin, and resistant to ampicillin and trimethoprim. The PCR detection of virulence gene showed that all the strains were positive for *tdh* (thermostable direct hemolysin) and *tlh* (themolabile hemolysin), but negative for *trh* (*tdh*-related hemolysin), and carried *toxRS/new* and *orf8* genes. According to PFGE cluster analysis, they were considered to be a highly related strains. According to MLST analysis, the results were all ST479 type. **Conclusion** The reason for the small outbreak of gastroenteritis was due to *Vibrio parahaemolyticus* O8 : K21, which shared common genetic characteristics. It harbored the *tdh* gene which was the key characteristic of pandemic strains, and additional surveillance should be conducted to facilitate control of the transmission of this pathogen.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; O8:K21 virulence genes; pulsed field gel electrophoresis; multilocus sequence typing

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是革兰阴性嗜盐菌,作为一种重要的人类食源性致病菌,其传播与食用受污染的海产品有关,主要引起胃肠

炎、伤口感染、败血症等疾病<sup>[1-2]</sup>。副溶血性弧菌最初于1950年被发现<sup>[3]</sup>,1996年在印度发现了一种新的O3:K6血清型克隆<sup>[4]</sup>,该克隆及其血清型变体随后在全世界范围内传播,成为一个大流行克隆群,引起多次大规模暴发事件。在我国副溶血性弧菌已被确定为细菌性食物中毒事件中的重要病原体,引起人们广泛关注<sup>[5]</sup>。2018年10月广州市某饭店发生一起食物中毒事件,患者出现腹痛、腹泻、呕吐,于医院就诊后肛拭培养副溶血性弧菌阳性。广州市番禺区和海珠区疾病预防控制中心分别对此次事件中各自辖区内哨点医院上报的副溶血性

收稿日期:2020-06-30

基金项目:广东省科技计划(2016A020215217);广州市科技计划(201707010130);广州市医药卫生科技(20171A011274);广州市医学重点学科建设(2017-2019-07)

作者简介:张晶 女 副主任技师 研究方向为病原微生物学研究  
E-mail:zhangjing9468@sina.cn

通信作者:白志军 男 主任技师 研究方向为病原微生物学研究  
E-mail:junewhite@163.com

弧菌病例进行采样检测并送至市疾控中心。为进一步了解致病因素,对阳性菌株进行血清型鉴定,药敏实验,毒力基因(*tdh*、*trh*、*tlh*)、*toxRS/new* 基因、*orf8* 基因<sup>[6]</sup>的聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测,脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)和多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)分析,以期为临床提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

采集肛拭子 14 份,其中番禺区患者标本 7 份、厨师标本 2 份,海珠区患者标本 5 份。肛拭子中共分离出 14 株副溶血性弧菌。

#### 1.1.2 主要培养基、试剂

3% NaCl 碱胨水增菌液、弧菌显色平板(广东环凯微生物有限公司);副溶血性弧菌(*tdh*、*trh*、*tlh*)三重核酸检测试剂盒(深圳生科源技术有限公司);副溶血性弧菌血清(日本 Denka Seiken 公司);限制性内切酶 *Xba* I、*Not* I(美国 NEB);琼脂糖 SeaKem Gold Agarose(瑞士 LONZA);蛋白酶 K(德国 Merck);TBE 缓冲液(索莱宝科技有限公司);引物合成纯化测序(广州昊天生物科技有限公司)。所有试剂均在有效期内使用。

#### 1.1.3 仪器与设备

VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定/药敏分析系统(法国生物梅里埃公司),CHEF Mapper 脉冲场凝胶电泳仪及凝胶成像系统(Bio-Rad 公司),7500 fast 荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株鉴定

参照卫生标准 WS/T 81-1996《副溶血性弧菌食物中毒诊断标准及处理原则》对采集样品增菌培养、分离纯化。

使用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定/药敏分析系统进行细菌生化鉴定。

### 1.2.2 血清型鉴定

取新鲜培养的菌苔至 3% NaCl 5% 甘油混合液中研磨均匀,121 °C 高压 1 h,12 000 r/min 离心 3 min(离心半径 5 cm),吸取上清,加入等体积的 3% NaCl 盐水重悬,玻片凝集检测 O 抗原。另取适量菌苔与 3% NaCl 盐水混合研磨检测 K 抗原。生理盐水作为对照。

### 1.2.3 药敏试验

参照临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)和欧洲抗菌药物敏感试验委员会(The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST),结合临床选择 12 种抗生素进行最低抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)试验,包括氨苄西林、头孢曲松、环丙沙星、氯霉素、阿米卡星、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、庆大霉素、萘啶酸、磺胺复合物、链霉素、四环素、甲氧苄氨嘧啶。结果判定参照 CLSI 2016 及 EUCAST 2015 标准。

### 1.2.4 毒力基因检测

挑取 1 环新鲜培养的菌苔于 100 μL DNA 裂解液中充分研磨,100 °C 水浴 10 min 后冰浴 5 min,12 000 r/min 离心 2 min(离心半径 5 cm),取上清 DNA 稀释液,保存待用。使用 Hot start green master mix(Promega)配制 25 μL 的反应体系检测 *toxRS/new* 和 *orf8* 片段,引物序列和 PCR 反应条件见表 1。使用三重核酸检测试剂盒检测毒力基因(*tdh*、*trh*、*tlh*)。参照说明书要求将提取的 DNA 模板加入预混反应体系,反应条件:50 °C 处理尿嘧啶-N-糖基化酶(Uracil-N-Glycosylase, UNG),2 min;95 °C 预变性,3 min;95 °C,5 s;55 °C,60 s,45 个循环。

### 1.2.5 PFGE 分型

根据 PulseNet China 副溶血性弧菌 PFGE 实验步骤对菌株进行分型分析。限制性内切酶选用 *Not* I,沙门菌标准菌株 H9812 作为分子量标准,内切酶选用 *Xba*I。电泳条件参照 Pulse Net 推荐标准,并在电泳缓冲液中加入 10 mg/mL 硫脲 760 μL。Gel Red 染色成像后使用 Bionumerics 6.6 软件进行聚类分析。

表 1 引物序列与片段长度

Table 1 Primer sequences and Fragment length

名称	引物序列/(5'→3')	片段大小/bp	反应条件
<i>toxRS/new</i>	TAA TGA GGT AGA AAC A	651	96 °C 5 min、96 °C 1 min、45 °C 2 min、72 °C 3 min、25 cycles、72 °C 7 min
	ACG TAA CGG GCC TAC A		
<i>orf8</i>	GTT CGC ATA CAG TTG AGG	746	94 °C 3 min、94 °C 30 s、57 °C 30 s、72 °C 1 min、30 cycles、72 °C 5 min
	AAG TAC AGC AGG AGT GAG		

### 1.2.6 MLST 分型

选择 MLST 网站(<https://pubmlst.org/vparahaemolyticus/info/protocol.shtml>)针对副溶血

性弧菌提供的 7 个管家基因(*recA*、*gyrB*、*dnaE*、*dtdS*、*pntA*、*pyrC*、*tnaA*)合成 7 对 PCR 引物。引物序列、反应条件及产物大小如网站所示。PCR 产物双向测

序后,获得的管家基因序列利用 Lasergene SeqMan 软件进行拼接和校正后,与数据库中已有菌株序列比较,获得管家基因序列号及 ST 型。

## 2 结果

### 2.1 病原菌分离鉴定及血清学分型

12 份患者和 2 份厨师肛拭子中共检测出 14 株副溶血性弧菌阳性菌株,血清型全部为 O8:K21 型。

### 2.2 药敏试验

14 株副溶血性弧菌对氨苄西林、甲氧苄氨嘧啶耐药,对头孢曲松、环丙沙星、氯霉素、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺复合物、阿米卡星、萘啶酸、链霉素、四环素、庆大霉素敏感。

### 2.3 毒力基因

实时荧光定量三重核酸检测试剂盒检测毒力基因显示,14 株菌毒力基因 *tdh*、*tlh* 全部为阳性,*trh* 全部阴性。PCR 检测全部都携带 *toxRS/new* 和 *orf8* 基因。

### 2.4 PFGE 分型

经脉冲场凝胶电泳分子分型,限制性内切酶 *Not I* 内切消化,14 株副溶血性弧菌形成聚类分析图,见图 1。由图可知,菌株条带数及带型位置完全一致,相似度 100%,为同一 PFGE 型别。



图 1 14 株副溶血性弧菌 PFGE 图像聚类分析图

Figure 1 Dendrogram illustrating the clustering of PFGE patterns of the 14 *Vibrio parahaemolyticus* strains

### 2.5 MLST 分型

14 株 O8:K21 型副溶血性弧菌 7 个管家基因扩增片段测序结果与 MLST 数据库等位基因信息比对,得到的序列种类编号分别为 *recA*: 181、*gyrB*: 252、*dnaE*: 186、*didS*: 29、*pntA*: 4、*pyrC*: 18、*tnaA*: 132。14 株菌株的 ST 型均为 479,所有菌株无差异。

## 3 讨论

副溶血性弧菌具有高度的遗传多样性和复杂的种群结构,血清型鉴定是该菌分类的主要依据。1996 年,一种新型 O3:K6 血清型副溶血性弧菌首次

在印度出现,该流行株打破了其他克隆局部散发的特点,能引发大规模流行,此后迅速在全球跨地区跨人群高水平传播,并不断出现新的血清型变异株。截至 2016 年,世界各地的实验室发现与大流行有关的克隆至少有 49 种血清型<sup>[7]</sup>。这些血清型和 O3:K6 大流行克隆在遗传学上高度一致,是由同一株 O3:K6 血清型菌株通过菌体抗原(O)和荚膜抗原(K)变异衍生而来,具有以下特异性遗传标记:耐热直接溶血素(*tdh*)基因阳性,*tdh* 相关溶血素(*trh*)基因阴性,*toxRS/new* 基因阳性和/或丝状噬菌体 *orf8* 基因阳性,统称为 O3:K6 克隆<sup>[6]</sup>。

本次食物中毒事件中,从 12 例患者和 2 名厨师肛拭子中共分离出 14 株副溶血性弧菌,血清型均为 O8:K21。对 14 株弧菌进行毒力基因检测,结果显示所有菌株均检出 *tdh*、*tlh*、*toxRS/new* 和 *orf8* 基因,携带率 100.0%,未检出 *trh* 基因。PFGE 结果显示 14 株菌株的电泳条带相似度为 100.0%,MLST 试验结果显示所有菌株均为 ST479 型,提示病例株与厨师株高度同源,符合食物中毒的特征,且符合 O3:K6 大流行克隆特征,同属副溶血性弧菌大流行克隆株。根据“同一起暴发分离菌株的 TENNOVER 判定原则”<sup>[8]</sup>,同一亲代的个体具有共同的遗传物质,实验室判断检出的所有菌株为同一来源。由于副溶血性弧菌食物中毒具有一定的潜伏期和发病时间,餐饮单位未能及时留样,实验室未从可疑食品和环境涂抹样中分离出相关菌株,不能判断本次事件的病因食品,并且厨师肛拭子和患者肛拭子中的 O8:K21 型副溶血性弧菌虽然完全一致,但尚不能推断是厨师带菌引发的本次食物中毒,而厨师也可能由于共同暴露于同一污染源,是此次副溶血性弧菌导致的患者之一。

药敏结果显示 14 株菌对氨苄西林、甲氧苄氨嘧啶耐药,对头孢曲松、环丙沙星、氯霉素、磺胺甲噁唑/甲氧苄啶、磺胺复合物、阿米卡星、萘啶酸、链霉素、四环素、庆大霉素敏感,与其他地区情况相似<sup>[9]</sup>。临床用药应根据药敏结果合理规范用药,降低副溶血性弧菌的耐药性变异和多重耐药风险<sup>[10]</sup>。

既往研究<sup>[11]</sup>表明,广州地区出现的副溶血性弧菌疫情以 O3:K6 和 O4:K8 为主,此次案例中分离出的血清型 O8:K21 与流行趋势不相同,引起的食物中毒事件也鲜少报道,属广州地区首例,但其都具有大流行克隆菌株的特征,组成了独特的 O3:K6 大流行克隆株的衍生型菌株,推断可能是弧菌在传播过程中,在基因水平发生了大片段转移和重组,获得了 *toxRS/new* 基因和(或)丝状噬菌体 *orf8* 基因等

毒力基因及毒力岛,同时为适应环境中各种因素的变化,如温度、营养成分等,菌体抗原(O)和荚膜抗原(K)发生转换,引起致病表型的超强变异,促进血清型多样性的出现<sup>[12]</sup>。

大流行株的出现和持续存在是公共卫生相关部门密切关注的问题,是控制副溶血性弧菌感染的全球性新挑战<sup>[13]</sup>。针对这一情况,建议研究人员进一步对环境和临床分离到的大流行株进行分子特征研究,掌握本地区大流行株分布情况、流行特征及其遗传相关性,为副溶血性弧菌疾病的流行病学调查、溯源分析及耐药机制提供遗传学和分子流行病学信息,做好防控预警。

## 参考文献

- [ 1 ] MEAD P S, SLUTSKER L, DIETZ V, et al. Food-related illness and death in the United States[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5(5): 607-625.
- [ 2 ] DANIELS N A, MACKINNON L, BISHOP R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States, 1973-1998[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(5): 1661-1666.
- [ 3 ] LETCHUMANAN V, YIN W F, LEE L H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from retail shrimps in Malaysia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:33.
- [ 4 ] 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]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35:3150-3155.
- [ 5 ] WU Y N, WEN J, MA Y, et al. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003-2008[J]. *Food Control*, 2014, 46:197-202.
- [ 6 ] 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]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38(2): 578-585.
- [ 7 ] HAN C X, TANG H, REN C L, et al. Sero-prevalence and genetic diversity of pandemic *V. parahaemolyticus* strains occurring at a global scale[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:567.
- [ 8 ] 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]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [ 9 ] 李薇薇, 梅玲玲, 唐震等. 2007-2009年中国副溶血弧菌临床分离株分子特征分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2014, 48(1): 44-52.
- [ 10 ] ELMAHDI S, DASILVA LV, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrioparahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review[J]. *Food Microbiology*, 2016, 57:128-134.
- [ 11 ] 张晶, 龚玉娇, 陈佳璇等. 广州地区 70 株副溶血性弧菌病原学特征分析[J]. *现代预防医学*, 2018, 45(4): 704-707.
- [ 12 ] 徐苗苗, 刘静雯. 副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 大流行克隆的溯源[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 2112-2121.
- [ 13 ] HAN D S, YU F, CHEN X, et al. Challenges in *Vibrio Parahaemolyticus* infections caused by the pandemic clone[J]. *Future Microbiology*, 2019, 14:437-450.

## · 公告 ·

# 关于 $\beta$ -1,3/ $\alpha$ -1,3-葡聚糖等 6 种“三新食品”的公告

2021 年 第 5 号

根据《食品安全法》规定,审评机构组织专家对  $\beta$ -1,3/ $\alpha$ -1,3-葡聚糖等 4 种新食品原料和蛋白酶等 2 种食品添加剂新品种的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

附件:  $\beta$ -1,3/ $\alpha$ -1,3-葡聚糖等 4 种新食品原料和蛋白酶等 2 种食品添加剂新品种公告文本

国家卫生健康委  
食品安全标准与监测评估司  
二〇二一年四月十五日

相关链接: [www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202104/ae8afd8de4c84419b57fe7147d6f5206.shtml](http://www.nhc.gov.cn/sps/s7892/202104/ae8afd8de4c84419b57fe7147d6f5206.shtml)