

珠江三角洲地区副溶血性弧菌遗传多样性和致病性相关研究

吴葵^{1,2,3}, 吴清平², 张菊梅², 郭伟鹏²

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 广东广州 510301) (2. 广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东广州 510070) (3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种常见的食源性致病菌, 本文研究了珠江三角洲地区副溶血性弧菌的遗传多样性。从 54 株副溶血性弧菌出发, 研究了它们的 API20E 生化反应、抗生素耐药性、O 抗原血清型, 进行了 ERIC-PCR 分子分型, 并检测了两种毒力基因 *tdh* 和 *trh* 的分布。54 株副溶血性弧菌可被分为 6 个生化反应类群, 主要类群为 Biochem-A; 菌株对萘啶酮酸、环丙沙星、氟康唑均不耐药, 而对氟康唑耐药率最高, 耐药率 0.88; O 抗原血清型分别为 O1、O2、O3、O4、O5、O6、O8、O10、O11, O2 为主要血清型, O3 为临床主要血清型; ERIC-PCR 分子分型将 54 株菌分成 47 个型别, ERIC-PCR 图谱相似性大于 0.80 的类群有 12 个, 没有明显的优势类群; 有 12 株副溶血性弧菌为 *tdh* 阳性, 阳性率为 0.22, 其中 10 株为临床来源菌株; 有 2 株副溶血性弧菌为 *trh* 阳性, 阳性率为 0.04, 均为食品分离株。珠三角地区食品和临床来源的副溶血性弧菌具有丰富的遗传多样性。

关键词: 副溶血性弧菌; 遗传多样性; 生化分型; 抗生素耐药性; O-血清型; 分子分型; 毒力基因

文章编号: 1673-9078(2015)7-283-292

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.045

Genetic Diversity and Pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* Strains

Isolated from the Pearl River Delta District

WU Kui^{1,2,3}, WU Qing-ping², ZHANG Ju-mei², GUO Wei-peng²

(1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 501301, China) (2. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070, China) (3. University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a common food-borne pathogen. The work attempted to evaluate the genetic diversity of *V. parahaemolyticus* strains isolated from food and clinical samples in the Pearl River Delta (PRD) district. In total, fifty four *V. parahaemolyticus* strains were included in the study. Biochemical reaction tests were performed with the API20E system and antibiotic susceptibility was examined for eight common antibiotics: nalidixic acid (NAL), streptomycin (STR), cephalothin (CEP), ampicillin (AMP), ciprofloxacin (CIP), tetracyclin (TCY), chloramphenicol (CHL), and aztreonam (ATM). O-serotypes and prevalence of *tdh* and *trh* were determined using PCR methods. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR assays were performed for molecular typing. The 54 *V. parahaemolyticus* strains were grouped into six biochemical clusters, and Biochem-A was the dominant cluster. None of the strains was resistant to NAL, CIP, or CHL, while 48 strains (88%) were resistant to AMP. Nine O-serotypes (O1, O2, O3, O4, O5, O6, O8, O10, and O11) were detected; O2 was the main serotype and O3 was the main clinical serotype. Forty-seven genotypes were found by ERIC-PCR molecular typing and 12 clusters with a similarity of 0.80 were established, but none was dominant. Twelve strains (22%), including ten clinical isolates and two isolates derived from food sources, were *tdh*-positive. Only two strains (4%) from food samples were *trh*-positive. Dramatic genetic diversity of *V. parahaemolyticus* strains from the PRD district was confirmed in this study.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; genetic diversity; biochemical typing; O-serotypes; molecular typing; virulent genes

收稿日期: 2014-05-12

基金项目: 广东省自然科学基金研究团队项目 (S2012030006235); 广州市科技计划项目 (201300000074)

作者简介: 吴葵 (1985-) 男, 博士研究生, 主要从事副溶血性弧菌相关食品安全研究

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 主要从事微生物安全检测与控制研究

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种广泛存在于各种水产食品中的中度嗜盐菌。食用副溶血性弧菌污染的鱼、虾、贝类等水产品导致腹泻等食物中毒事件^[1]。国内外报导表明,各种食品尤其是水产品及其生产环境中副溶血性弧菌时有检出,副溶血性弧菌相关的食物中毒时有发生。2003~2005年广东省水产品污染状况调查显示,431份样品中,156份检出副溶血性弧菌,总检出率为36.19%^[2];美国一份研究表明,在俄勒冈州牡蛎养殖水体中存在高密度的副溶血性弧菌^[3]。2006年夏天,智利某地报导了900多例相关的腹泻病例^[4];2007年8月25日~9月25日,我国厦门市连续发生两起食物中毒,中毒2000余人^[5]。副溶血性弧菌已经成为国内外食源性食物中毒事件的重要诱因。

作为一种生长迅速的革兰氏阴性菌,不同来源的副溶血性弧菌差异巨大,来源相同或者接近的副溶血性弧菌经过传代多次也可能产生某些差异。这种遗传上的差异体现在方方面面,可以是某些特定食品检测相关的生化反应,可以是涉及临床用药的抗生素药敏反应,可以是免疫学上的血清型变化,也可以是分子水平的基因型别不同,还可以是致病相关的毒力基因差异。

广东省作为水产品的生产和消费大省是副溶血性弧菌食品安全事故发生的高危地区。通过广东省食源性致病菌监测网和食品污染物监测网,广东省疾病预防控制中心在2003-2008年间收集了不少于205株的副溶血性弧菌食物中毒分离株,可见广东地区副溶血性弧菌中毒事件的频繁发生^[6]。本研究在2010年到2011年时间段从广州和深圳这两个珠三角代表城市食品和临床环境中收集了大量副溶血性弧菌菌株,针对食品和临床来源的副溶血性弧菌菌株开展API20E生化反应、8种抗生素药敏反应、基于PCR技术的血清鉴定、分子分型以及直接耐热溶血素基因(thermostable direct hemolysin gene, *tdh*)和耐热相关溶血素基因(TDH-related hemolysin gene, *trh*)两种毒力基因的分子检测。通过本研究的完成,我们可以从更多角度认识珠三角地区副溶血性弧菌的遗传多样性以及食品来源和临床来源的VP菌株亲缘关系及遗传差异。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

表1 副溶血性弧菌菌株来源

Table 1 Sources of *V. parahaemolyticus* strains

菌株名称或编号	来源	菌株名称或编号	来源	菌株名称或编号	来源
ATCC33847 ¹	本实验室保存	VP20412	食品	SZ34	临床
VP7511	食品	VP20422	食品	SZ35	临床
VP7512	食品	VP20423	食品	SZ36	食品(食物中毒)
VP7533	食品	VP20613	食品	SZ38	临床
VP7912	食品	VP21412	食品	SZ40	临床
VP7922	食品	VP21413	食品	SZ42	食品(食物中毒)
VP8412	食品	VP21433	食品	SZ43	食品(食物中毒)
VP10332	食品	VP22321	食品	SZ44	食品(食物中毒)
VP11312	食品	VP22512	食品	SZ45	食品(食物中毒)
VP11621	食品	VP22523	食品	SZ46	食品(食物中毒)
VP12312	食品	VP22531	食品	SZ50	临床
VP12321	食品	VP22532	食品	SZ51	临床
VP12323	食品	VP22533	食品	SZ52	临床
VP12331	食品	SZ28	食品	SZ53	临床
VP12432	食品	SZ30	食品(食物中毒)	SZ54	临床
VP12513	食品	SZ31	食品(食物中毒)	SZ56	临床
VP17332	食品	SZ32	临床	SZ57	临床
VP17521	食品	SZ33	临床	SZ58	食品(食物中毒)

注: 1: 后续实验中, ATCC33847来源归类为“临床”类别进行统计。

本实验所用副溶血性弧菌菌株共54株, 53株于2010年~2011年从广州和深圳两个珠江三角洲地区重

点城市食品和临床样本中分离; ATCC33847 由本实验室保存, 最初由美国科研人员于马里兰州腹泻样本中分离。食品样本分离株 40 株, 31 株从正常市售食品中分离, 9 株从食物中毒病人进食过的食品中分离。临床样本分离株 13 株, 均来源于腹泻病人肛拭样本。ATCC33847 和分离自肛拭样本的副溶血性弧菌共 14 株菌株被归类为临床来源 (见表 1)。

1.2 副溶血性弧菌菌株的生化反应测试

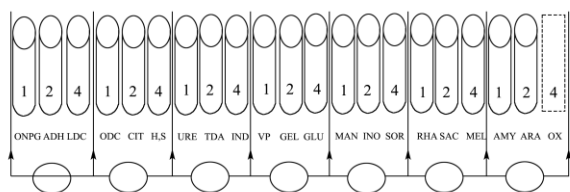


图 1 API20E 生化反应示意图

Fig.1 Biochemical reactions for API20E

利用法国生物梅里埃公司 API20E 生化鉴定条测试总共 54 株副溶血性弧菌的生化反应, 方法参照 API20E 说明书。将副溶血性弧菌划线接种于 3% NaCl 的营养琼脂上 37 °C 过夜培养, 从平板上挑取单菌落

于无菌生理盐水中, 调节菌悬液浓度约 0.5 个麦氏浊度, 将适当体积的菌悬液加入 API20E 反应条中, 36 °C 培养 18~24 h, 取出后参照说明书判断结果。图 1 为 API20 反应条示意图, 各反应底物及检测目标参见 API20E 说明书。以 API20E 生化反应结果为基础, 利用 NT sys 2.10e 软件进行聚类分析。

1.3 副溶血性弧菌菌株药敏试验

参照美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 抗菌药物敏感性试验执行标准推荐的纸片扩散法及判定标准进行。以大肠埃希菌 (*E. coli*) ATCC29522 为质控菌株, 选取 8 种临床常用的抗生素测试, 包括萘啶酮酸、链霉素、头孢噻吩、氨苄青霉素、环丙沙星、四环素、氯霉素、氨曲南, 所有抗生素纸片均购自 Oxid 公司。药片浓度和判断标准见表 2, 纸片抑菌圈直径小于分界值判断为耐药 (R), 大于分界值判断为敏感 (S), 属于分界值之间判断为中度耐药 (I)。培养基为 CLSI 推荐的 Mueller-Hinton (MH) 平板, 培养基中添加 NaCl 到 3% 用于副溶血性弧菌药敏试验。

表 2 副溶血性弧菌药敏试验抗生素信息

Table 2 Antibiotics used in *V. parahaemolyticus* antimicrobial susceptibility tests

抗生素名称	英文名	缩写	分类	药片浓度/(μg/片)	分界值/mm
萘啶酮酸	Nalidixic acid	NAL	喹诺酮类	30	13~19
链霉素	Streptomycin	STR	氨基糖苷类	10	11~15
头孢噻吩	Cephalothin	CEP	头孢类	30	14~18
氨苄青霉素	Ampicillin	AMP	青霉素类	10	13~17
环丙沙星	Ciprofloxacin	CIP	喹诺酮类	5	15~21
四环素	Tetracyclin	TCY	四环素类	30	14~19
氯霉素	Chloramphenicol	CHL	氯霉素	30	12~18
氨曲南	Aztreonam	ATM	β-内酰胺类	30	18~20

1.4 副溶血性弧菌基因组 DNA 提取

将所有副溶血性弧菌于 3% NaCl 的营养肉汤中培养过夜, 菌液用于基因组 DNA 提取。使用东盛公司基因组抽提试剂盒提取各副溶血性弧菌基因组 DNA。获得的基因组 DNA-20 °C 保存, 准备用于后续实验。

1.5 副溶血性弧菌 O 抗原 PCR 鉴定

一般来说病原菌的血清鉴定主要采用的是免疫学方法, 通过观察目标菌株与各种特异性抗血清的凝聚反应判断目标菌株的血清型。2012 年, Chen 等报道了一种用于鉴定副溶血性弧菌 O 抗原的分子方法^[7]。本实验采用 Chen 的方法进行。简单的说: 利用 2

个多重 PCR 体系对 12 种 O 抗原编码基因进行特异性扩增。体系 1 中包含对应于 O1、O2、O4、O5、O6、O10 的引物, 体系 2 中包含 O3、O7、O8、O9、O11、O12 引物。本实验所有引物均由华大基因公司合成, 引物具体信息见表 3。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次。副溶血性弧菌 DNA 样本仅在两套 PCR 体系的扩增结果中出现一个特异性扩增片段, 根据特异性片段大小判断副溶血性弧菌 O 抗原血清型。

1.6 副溶血性弧菌 ERIC-PCR 分析

ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) 是肠道细菌基因组中的一种常见的基因间重复序列, 以 ERIC 核心区的高度保守序列设计引物

进行 PCR 即是 ERIC-PCR。由于细菌基因组间存在各种差异, 比较菌株 ERIC-PCR 谱图可以对细菌进行分子分型和追踪溯源。经过数十年的开发和验证,

ERIC-PCR 已被认为是一种有效简便的分子分型技术, 在副溶血性弧菌^[8]、阪崎肠杆菌^[9]、空肠弯曲菌^[10]等食源性致病菌中成功运用。

表 3 本实验使用的引物

Table 3 Primers used in this study

目标基因	引物名称	引物序列	扩增产物大小/bp
O 抗原基因 PCR 体系 1			
O1- <i>wvaG</i>	wvaGF	CAACATAACCACGTCTGAACC	474
	wvaGR	TCGTGTATTTATTAGTTTCGG	
O2- <i>wvaR</i>	wvaRF	TCCGAGGGATATTGAAGGGT	238
	wvaRR	AATCGTCCGATAGGCTTGC	
O4- <i>orf16</i>	orf16F	TCTTCCGCCAACTCAGCA	671
	orf16R	TCAGTTGGAGACTCGCCTTC	
O5- <i>wvcA</i>	wvcAF	ATGCGATGACTAAAAAAGGGT	852
	wvcAR	ATTTATTGATCGGCAAGAAGTC	
O6- <i>wvcJ</i>	wvcJF	GCACTCGGAAACCAGAGATTA	1409
	wvcJR	GCTAACTCCTCGCTATCAG	
O10- <i>wvcP</i>	wvcPIF	GTAACCTCGCCTTTCCTCG	343
	wvcPIR	CGGACTCTGCGAAAGTAAAG	
O 抗原基因 PCR 体系 2			
O3- <i>VP205</i>	VP205F	CAAATGCGTAACGGTAACA	868
	VP205R	TGACCATCAGGACCGTAAGT	
O7- <i>wvcN</i>	wvcNF	GCGGCATTGAACCAGAC	385
	wvcNR	TATTTTCGAGTGTGTACGGC	
O8- <i>wvdG</i>	wvdGF	ATTGGTGGAAATGGACGAGT	680
	wvdGR	TGGCAACTCACAGAGCTCAT	
O9- <i>wvdH</i>	wvdHF	TAATGAAATAGAAGTCGTGGC	419
	wvdHR	GTATTCCCTGAACTGGCTC	
O11- <i>wvdB</i>	wvdBF	TGGTCTTTGGCTTGCTCAC	524
	wvdBR	GATTTCCATACAGGCTAACG	
O12- <i>wvcP</i>	wvcP2F	TGACGGTCAAAGAGCTACGC	256
	wvcP2R	ACGGACTCTGCGAAAGTAAAG	
毒力基因检测			
<i>tdh</i>	TDH434F	AGCTTCCATCTGTCCCTTTT	434
	TDH434R	ATTACCACTACCACTCTCATA	
<i>trh</i>	TRH250F	GGCTCAAATGGTTAAGCG	250
	TRH250R	CATTTCCGCTCTCATATGC	
ERIC-PCR 分子分型			
	ERIC1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTACAC	
	ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	

根据相关文献报道^[8-11], 直接利用 ERIC1 和 ERIC2 两条引物进行 ERIC-PCR 分子分型, 引物序列见表 3。PCR 使用 Takara 公司 Premix Taq 试剂盒, PCR 反应体系为 20 μL, 含有 Taq 酶 1 U, dNTP 各 0.2 mmol/L, 引物各 0.4 μmol/L, 1 μL 副溶血性弧菌基因

组 DNA (20 ng-200 ng) 加入反应体系作为模板。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 4 min, 循环 30 次, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物以 2% 琼脂糖进行凝胶电泳, 然后在凝胶成像仪上观察电泳结果。ERIC-PCR 电泳

图像使用 Gel-Pro Analyzer 4.0 进行分析, 根据图像分析结果, 以 NT sys 2.10e 软件进行聚类分析构建分子遗传树状图。

1.7 副溶血性弧菌 *tdh*、*trh* 基因分子检测

使用 TDH434F/TDH434R 和 TRH250F/TRH250R 分别扩增副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 基因, 两种基因分开检测, 引物序列见表 3。 *tdh* 和 *trh* 的 PCR 检测均使用 Takara 公司 *Premix Taq* 试剂盒, 体系中各引物终浓度为 0.4 mmol/L。两套 PCR 体系使用相同的 PCR 反应程序: 95 °C 预变性 4 min, 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次。 *tdh* 扩增的阳性片段大小为 434 bp, *trh* 扩增阳性片段大小为 250 bp。

2 结果与分析

2.1 副溶血性弧菌 API20E 生化反应分析

API20E 的生化反应结果显示, 所有 54 株副溶血性弧菌的 21 个生化反应中, 有 11 个反应结果一致: LDC 反应阳性、ODC 反应阳性、H₂S 反应阴性、TDA 反应阴性、IND 反应阳性、GLU 反应阳性、MAN 反应阳性、SOR 反应阴性、SAC 反应阴性、MEL 反应阴性、OX 反应阳性。其他 10 个不完全一致的生化反应中, ONPG 反应只有 2 个阳性 (SZ50、SZ53), ADH

反应只有 1 个阳性 (VP21413), URE 反应只有 2 个阳性 (VP11312、VP11621), GEL 反应只有 3 个反应阴性 (SZ36、SZ46、SZ57), INO 反应只有 1 个反应阳性 (VP21413), RHA 反应只有 2 个阳性 (VP12323、VP17521), ARA 反应有 5 个阴性, CIT 反应阳性率为 0.72(39/54), VP 反应阳性率为 0.17 (9/54), AMY 反应阳性率为 0.52 (28/54)。根据所有 21 个生化反应的结果, 用 NT sys 2.10e 软件聚类分析 (见图 2)。54 株副溶血性弧菌共被分为 20 个 API20E 生化反应型。由于 API20E 用于肠杆菌科各种属的生化鉴定, 相同种属的细菌生化反应结果具有一定的稳定性, 因而所有副溶血性弧菌菌株生化反应型相互之间的相似性大于 0.80。以相似性 0.90 为界, 54 株副溶血性弧菌分为 Biochem-A、Biochem-B、Biochem-C、Biochem-D、Biochem-E、Biochem-F, 6 个类群。其中, Biochem-A 簇为主要类群, 包含 11 个生化反应型共 45 株分别来源于食品和临床的副溶血性弧菌菌株。ATCC33847 的生化型别也归类到 Biochem-A 簇。临床来源的菌株分布于 Biochem-A 簇和 Biochem-C 簇中, 其中 Biochem-A 簇含有 13 株临床分离株, Biochem-C 含有 1 株临床分离株 SZ57。食品来源的副溶血性弧菌在所有 6 簇中均有分布, 显示它们比临床菌株具有更多样的生化反应型别。

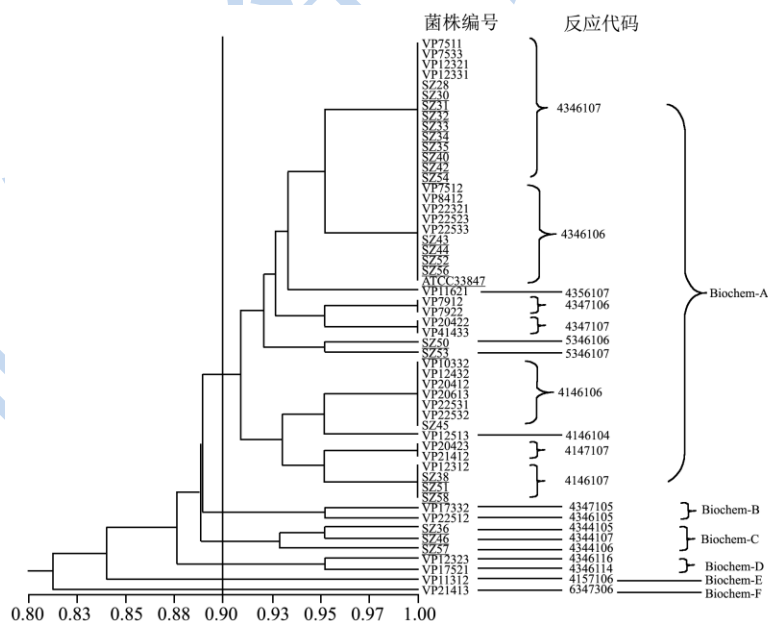


图 2 副溶血性弧菌 API20E 生化反应型别。

Fig.2 *V. parahaemolyticus* biochemical types based on API20E

注: 下划横线菌株为临床来源; 划虚线为食物中毒食品来源, 下同。

2.2 副溶血性弧菌抗生素耐药性分析

副溶血性弧菌对 8 种抗生素的耐药性具有明显的

差异, 具体数据如表 4 所示。没有发现针对 NAL、CIP、CHL 耐药的菌株, 但是只有 CHL 的敏感率达到 1, NAL 存在 0.11 的中度耐药, 而 CIP 的中度耐药比率

达到 0.41, 暗示副溶血性弧菌对这两种抗生素有较大可能产生耐药。STR 和 TCY 对副溶血性弧菌的抑菌作用也较明显, 虽然在生产生活上使用较多, 但是各只发现 1 株针对这两种抗生素的耐药菌。同时需要注意的是一部分副溶血性弧菌针对 STR 和 TCY 产生中度耐药 (0.31 和 0.30)。对 CEP、AMP、ATM, 这些菌株呈现不同程度的耐药, 其中以 AMP 耐药最为突出, 有 48 株耐药, 耐药率达到 0.88。虽然对于 CEP、AMP、ATM 耐药可以部分归因于它们的频繁使用, 但是头孢类的 CEP、传统青霉素的 AMP、单酰胺环的 ATM 这 3 种抗生素同属于 β -内酰胺类抗生素大家族, 暗示这一类抗生素对副溶血性弧菌的抑制效果不佳。比较食品来源菌株和临床来源菌株的抗生素药敏结果, 我们发现两种来源的菌株的抗生素耐药情况基

本一致: 针对食品来源菌株有明显抑制作用的抗生素对临床来源菌株同样有效, 而在食品来源菌株中存在较大概率耐药的抗生素对临床来源的菌株抑制效果同样不明显。总体来说多重耐药主要发生于 β -内酰胺类抗生素之间, 且在食品来源菌株和临床来源来源菌株中情况相似。以完全耐药 (R) 统计, 29 株菌株分别存在 STR-AMP、CEP-AMP、AMP-ATM、TCY-ATM 双重耐药和 CEP-AMP-ATM 三重耐药, 其中 CEP-AMP 耐药 5 株, 除 ATCC33847 外均来源于食品; AMP-ATM 耐药最多, 有 18 株, 11 株来源于食品, 7 株来源于临床; STR-AMP 耐药 1 株, 来源于临床; TCY-ATM 耐药 1 株, 它来源于食品; CEP-AMP-ATM 三重耐药 4 株, 食品来源和临床来源各 2 株。

表 4 副溶血性弧菌抗生素药敏实验结果

Table 4 Results of *V. parahaemolyticus* antibiotic susceptibility tests

抗生素	食品			临床 ^a			总计		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
NAL	0.85(34) ^b	0.15(6)	0(0)	1.00(14)	0(0)	0(0)	0.89(48)	0.11(6)	0(0)
STR	0.67(27)	0.33(13)	0(0)	0.64(9)	0.29(4)	0.07(1)	0.67(36)	0.31(17)	0.02(1)
CEP	0.20(8)	0.60(24)	0.20(8)	0.07(1)	0.71(10)	0.22(3)	0.17(9)	0.63(34)	0.20(11)
AMP	0.08(3)	0.05(2)	0.87(35)	0(0)	0.07(1)	0.93(13)	0.06(3)	0.06(3)	0.88(48)
CIP	0.62(25)	0.38(15)	0(0)	0.50(7)	0.50(7)	0(0)	0.59(32)	0.41(22)	0(0)
TCY	0.70(28)	0.27(11)	0.03(1)	0.64(9)	0.36(5)	0(0)	0.68(37)	0.30(16)	0.02(1)
CHL	1.00(40)	0(0)	0(0)	1.00(14)	0(0)	0(0)	1.00(54)	0(0)	0(0)
ATM	0.03(1)	0.55(22)	0.42(17)	0.21(3)	0.21(3)	0.58(8)	0.08(4)	0.46(25)	0.46(25)

注: a: ATCC33847 当成临床分离菌株统计结果; b: 括号内的数据为菌株数量, 括号外的数据为所占比率。

2.3 副溶血性弧菌 O 抗原鉴定

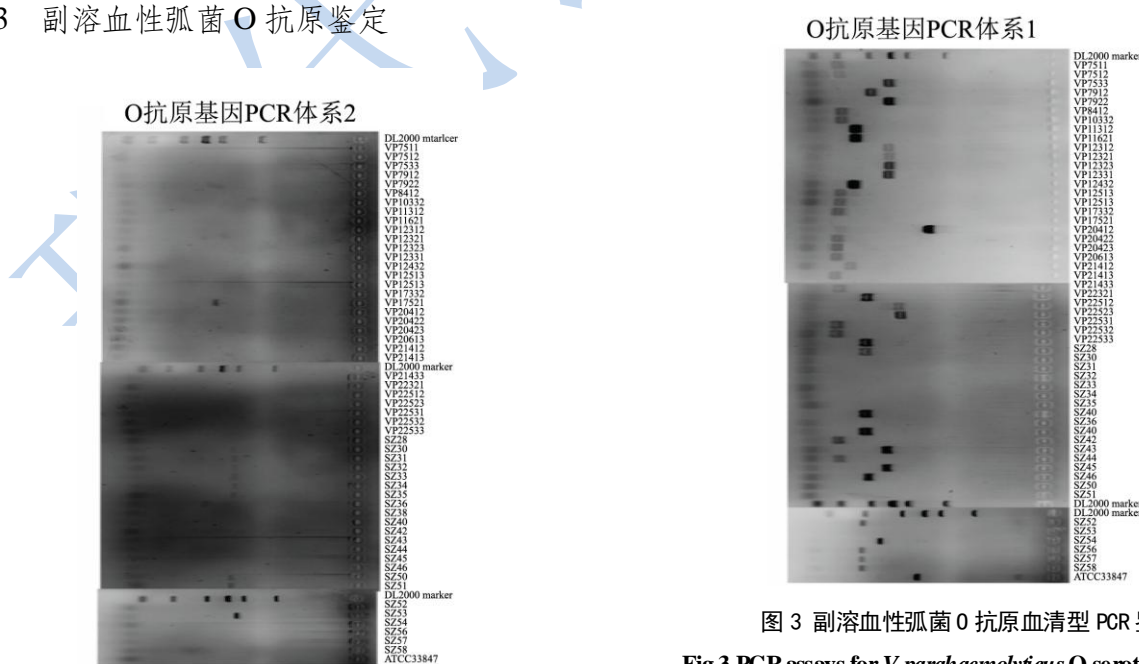


图 3 副溶血性弧菌 O 抗原血清型 PCR 鉴定

Fig.3 PCR assays for *V. parahaemolyticus* O-serotype detection

通常来说,致病菌的血清型鉴定需要一个免疫学实验过程,通过致病菌与特异性抗血清的凝聚实验结果,判断菌株的血清型。近年来随着病原菌研究的深入和基因组测序技术的发展,各种病原菌血清型抗原编码基因逐步鉴定出来,根据血清型抗原编码基因的序列设计特异性引物,就可以通过PCR的方法鉴定病原菌血清型。O抗原血清型的PCR鉴定已经在某些细菌中实现。本实验室Chen等使用PCR技术实现对来源于华南地区单核细胞增生李斯特氏菌分离株的O血清型鉴定^[12]。Chen等开发了一种利用双体系多重PCR鉴定副溶血性弧菌O血清型的方法^[7]。根据Chen的方法,我们利用双体系多重PCR鉴定了54株副溶血性弧菌的O抗原血清型,PCR结果见图3。

所有的菌株被分别鉴定为: O1、O2、O3、O4、O5、O6、O8、O10、O11, 9个O血清型(表5)。这些副溶血性弧菌的O血清型主要为O2(19株),其次为O3(9株)、O4(9株)、O1(8株)和O10(5株),它们分别占菌株总数的35%、17%、17%、15%、9%。

血清型O5、O6、O8、O11各只有一个。虽然本实验仅检出9个血清型,但是考察菌株来源,我们依旧可以发现一些规律。珠三角地区食品来源的副溶血性弧菌有16株O抗原血清型为O2,达到所有食品来源菌株的40%;而临床来源的副溶血性弧菌O抗原血清型主要为O3,在总共14株临床来源的菌株中有7株为O3,达到50%。食品来源的菌株具有9个血清型,而临床来源的只有5个,说明野生环境中副溶血性弧菌菌株O抗原血清型比临床环境中具有更加丰富的多样性。通过表5还可以看出,在食品来源菌株中出现频率较高的血清型往往也能在临床菌株中检出,暗示副溶血弧菌作为一种食源性致病菌,食品分离株和临床分离株存在密切的联系。O3血清型在临床菌株中大量检出与国内外相关报道一致。O3: K6血清型菌株是近20年来国内外副溶血性弧菌食物中毒事件的罪魁祸首,这一类群也被称为“大流行株系”(the“pandemic group”)^[13]。本研究鉴定的O3血清型菌株K抗原血清型是否为K6还需进一步研究。

表5 副溶血性弧菌O抗原血清型

Table 5 O-serotypes of *V. parahaemolyticus* strains

O-血清型	菌株	来源/株		总计/株
		食品	临床	
O1	VP7912, VP22321, VP22523, VP22533, SZ28, SZ38, SZ40, SZ46	6	2	8
O2	VP7511, VP7512, VP8412, VP10332, VP12513, VP17332, VP20422, VP20423, VP20613, VP21413, VP21433, VP22531, VP22532, SZ42, SZ44, SZ52, SZ56, SZ57, SZ58	16	3	19
O3*	SZ30, SZ31, SZ32, SZ33, SZ34, SZ35, SZ50, SZ51, SZ53	2	7	9
O4	VP7533, VP7922, VP12312, VP12321, VP12323, VP12331, SZ43, SZ45, ATCC33847	8	1	9
O5	VP22512	1	0	1
O6	VP20412	1	0	1
O8	VP17521	1	0	1
O10	VP11312, VP11621, VP12432, VP21412, SZ54	4	1	5
O11	SZ36	1	0	1

注: *; Chen报导的方法并不能有效区分O3与O13血清型, O3血清型的判断需额外进行血清学验证。

2.4 副溶血性弧菌ERIC-PCR分子分型分析

作为一种有效的分子分型手段,ERIC-PCR成功将54株副溶血性弧菌分成47个型,如图4所示。54株副溶血性弧菌ERIC-PCR指纹图谱相似性在0.57-1.00之间,表明不同菌株之间的可能存在较大的遗传差异。需要注意的是VP12312和VP12513共2株,VP11312和VP11621共2株,SZ30、SZ31、SZ32、SZ33、SZ34共5株,SZ38、SZ40共两株,相互之间的相似性达到1.00,说明它们之间的亲缘关系极其密

切。为了更好的了解珠江三角洲地区来源的副溶血性弧菌分子遗传多样性以及亲缘关系,选取了相似性0.70、0.80和0.90三个节点对ERIC-PCR树状图进行分析。当以0.80相似性为界时,菌株可以被分为ERIC-A、ERIC-B、ERIC-C、ERIC-D、ERIC-E、ERIC-F、ERIC-G、ERIC-H、ERIC-I、ERIC-J、ERIC-K、ERIC-L共12簇。食品来源的副溶血性弧菌没有明显优势的ERIC分子型别,而临床来源菌株呈现一定程度的聚集。ERIC-G簇9株副溶血性弧菌中6株为临床分离株,ERIC-G为临床来源的副溶血性弧菌的主要分子

型别。本实验室郑扬云等报导来源于同一样本的空肠弯曲菌菌株之间相似性基本大于 0.80^[10]，说明即便这些副溶血性弧菌来源可能不同，它们之间也存在较为密切的关系。当以 0.90 为界时，54 菌株可聚类为 34 个类群，体现了较 API20E 生化反应型更加丰富的多

样性。当以 0.70 为界时，所有菌株可分为 4 大类群。其中，ERIC-A、ERIC-B、ERIC-C、ERIC-D 归为 1 个类群，说明它们互相之间的亲缘关系较与其它簇的亲缘关系近；ERIC-E、ERIC-F、ERIC-G、ERIC-H 归为一类同样说明它们有更紧密的亲缘关系。

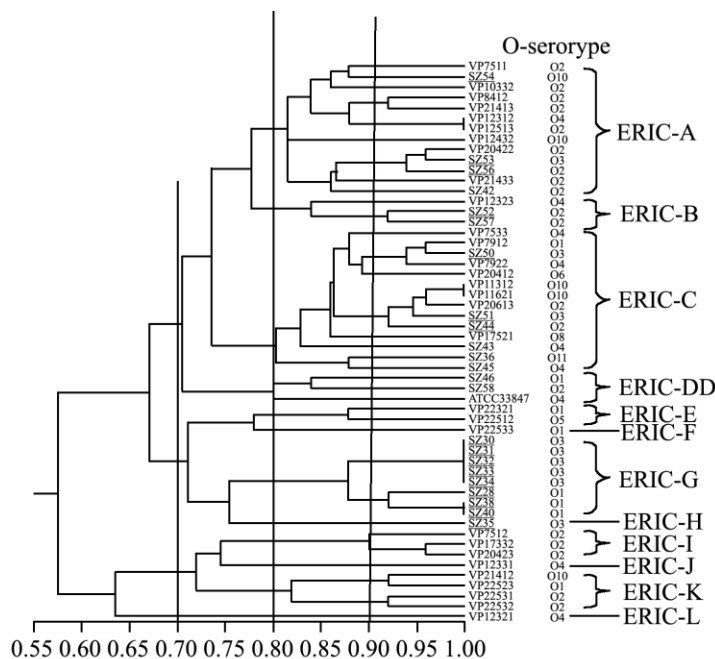


图 4 副溶血性弧菌基于 ERIC-PCR 的系统树

Fig. 4 Dendrogram of *V. parahaemolyticus* strains based on ERIC-PCR results

2.5 副溶血性弧菌毒力基因检测

副溶血性弧菌能够引起严重的食品安全问题，除了由于它在水产食品中的广泛分布和严重污染外，另外一个重要原因在于某些关键的毒力因子，如直接耐热溶血素 TDH 和耐热相关溶血素 TRH。TDH^[14]是一种穿孔素蛋白，对热耐受，可使人的红细胞发生溶血，有心脏毒性；TRH 和 TDH 具有部分同源性，但溶血谱不同于 TDH，也不能耐热。本研究通过 PCR 方法检测了这两种溶血素的编码基因 *tdh* 和 *trh*，结果见表 6。食品来源的菌株中 *tdh* 阳性率为 0.05，2 株阳性菌株还是来自导致食物中毒的食品样本，说明大多数野生环境来源的菌株不带有 *tdh*；14 株临床来源的副溶

血性弧菌中 *tdh* 阳性有 10 株，占 0.71，说明 *tdh* 与副溶血性弧菌致病有紧密联系。这个结果与 Su 的论述一致^[1]。*trh* 基因在临床分离株中未检出，在食品来源株也仅仅检出 2 株（阳性率 0.05），总阳性率为 0.04。

表 6 副溶血性弧菌毒力基因检测结果

Table 6 Virulent gene detection in *V. parahaemolyticus* strains

毒力基因	阳性菌株		
	食品	临床	总计
<i>tdh</i>	2(0.05)**	10(0.71)	12(0.22)
<i>trh</i>	2(0.05)	0(0)	2(0.04)

注：** 括号外为阳性菌株数量，括号内为阳性菌株比率。

2.6 副溶血性弧菌不同遗传特征关联性分析

表 7 5 株副溶血性弧菌遗传多样性信息

Table 7 Genetic diversity parameters of the five *V. parahaemolyticus* strains

菌株	生化型别归类	抗生素耐药型	O 血清型	ERIC 型别归类	毒力基因	
					<i>tdh</i>	<i>trh</i>
SZ30	Biochem-A	AMP-ATM	O3	ERIC-G	+	-
SZ31	Biochem-A	CEP-AMP	O3	ERIC-G	+	-
SZ32	Biochem-A	CEP-AMP-ATM	O3	ERIC-G	+	-
SZ33	Biochem-A	AMP	O3	ERIC-G	+	-
SZ34	Biochem-A	AMP-ATM	O3	ERIC-G	+	-

本研究考察了珠江三角洲地区食品和临床来源的副溶血性弧菌菌株多个遗传多样性特征,包括以 API20E 生化反应考察的生化代谢特征、以 8 种抗生素考察的抗药性特征、以 O 抗原基因检测考察的血清学特征、以 ERIC-PCR 考察的基因组分子分型特征以及以 PCR 方法检测的毒力基因特征。

我们发现,不同角度得出的遗传多样性信息并不完全一致,但具有一定程度的对应性。相同生化型的菌株可能具有不同的 ERIC 分子型,相同的 ERIC 分子型也可能具有不同的生化型,相同血清型或抗生素谱型的菌株也可能被归类为不同的生化型或分子型。这也正体现了副溶血性弧菌遗传特征的丰富性以及进行多角度研究的必要性。部分亲缘关系密切的菌株,它们的遗传多样性特征可以在各遗传特征分析中体现一致,显示了不同角度得出的遗传多样性信息的对应性。SZ30、SZ31、SZ32、SZ33、SZ34, 5 株副溶血性弧菌中虽然 SZ30 和 SZ31 为食物中毒食品来源, SZ32、SZ33、SZ34 为临床来源,但它们来源于同一食物中毒事件,分离 SZ30 和 SZ31 的食品样本为分离 SZ32、SZ33、SZ34 的临床样本的疑似污染源。表 7 为这 5 株副溶血性弧菌的各遗传多样检测结果。除了抗生素耐药谱,它们之间的各种特征保持高度一致: API20E 反应将它们归类到 Biochem-A 簇, ERIC-PCR 也同样将它们归类到 1 簇 (ERIC-G),它们还具有相同 O 血清型 (O3) 和毒力基因型 (*tdh* 阳性和 *trh* 阴性)。这种遗传特征的对应性对于副溶血性弧菌的监控溯源以及基础研究具有一定的指导意义。

3 结论

3.1 珠江三角洲地区食品和临床来源的副溶血性弧菌具有丰富的遗传多样性

54 株副溶血性弧菌的 API20E 反应可以得出 20 个反应代码并聚类成 6 大簇,以 Biochem-A 为主要生化型别。利用文中 8 种抗生素进行药敏试验可以发现副溶血性弧菌对 NAL、CIP、CHL 均不耐药,而对 AMP 耐药率最高,达到 0.88,多重耐药以 AMP-ATM 为主,有 18 株该类型的耐药菌。菌株 O 抗原血清型有 9 个,主要型别为 O2 血清型共 19 株,在两种来源的菌株中均有检出,而临床上的流行血清型为 O3。ERIC-PCR 分析将菌株分为 12 类 (以 0.80 为界),没有明显的流行类群,以 ERIC-A 和 ERIC-C 最多 (13 株和 14 株),但它们在相似度分界值为 0.70 时归为 1 簇(图 4),可以认为由 ERIC-A、ERIC-B、ERIC-C、

ERIC-D 组成的超簇 (33 株) 是主要类群。除了在临床上检出较多 *tdh* 阳性菌株, *tdh* 和 *trh* 检出率总体较低 (0.22 和 0.4)。以上数据,从 5 个方面反映了珠江三角洲地区副溶血性弧菌的遗传多样性特征。本实验室正在继续开展了广东地区食品中各类病原菌的污染调查,随着得到的副溶血性弧菌菌株持续增加,珠三角地区副溶血性弧菌的遗传多样性特征更能得到系统和充分的认识。

3.2 食品和临床来源的副溶血性弧菌菌株遗传多样性存在差异

本研究发现食品来源和临床来源的两类菌株之间各遗传多样性特征具有不同程度的差异。最明显的差异来源于毒力基因的差异:临床来源菌株 70% 以上带有 *tdh* 基因而在食品分离株中很少检出。其次血清型差异同样明显,临床分离株主要血清型为 O3 而食品来源的菌株血清型主要为 O2。生化分型和 ERIC-PCR 分子分型结果中,临床来源的菌株更加倾向于聚集在一起,而食品来源的菌株相互之间体现出亲缘关系更为疏远。

食品来源的副溶血性弧菌菌株相比临床来源的菌株具有更大的遗传多样性。除了生化分型和分子分型, O 血清型分析和毒力基因检测同样体现了这一规律。食品来源的菌株在检出的 9 种 O 血清型中均有分布,而临床菌株只存在于其中 5 个血清型中。食品来源菌株除了有少量检出 *tdh* 阳性外还有少量检出 *trh* 阳性,而 14 株临床来源菌株未检出 *trh* 阳性菌株。除了样本量可能不够外,更深层次的原因可能在于:食品安全事件往往是在特定的环境状况下瞬间爆发,少量强毒性的副溶血性弧菌短时间内大量繁殖并从临床检出,而野生环境下,不同的副溶血性弧菌在不同的环境条件下自然进化,形成更多的遗传多样性。可以说,食品来源菌株的丰富遗传多样性是临床来源菌株遗传多样性的基础。

3.3 展望

作为水产品生产消费重要地区和副溶血性弧菌相关食品安全事件高发地区,珠三角地区中副溶血性弧菌的食品安全危害理应受到更多的关注。对副溶血性弧菌的预防控制,除了围绕食品安全事件分析临床分离菌株的流行病学特征、研究菌株致病机制外,我们还需要从水产食品这个源头入手,研究副溶血性弧菌在野生环境中的生存生长机制,从而有效的预防和控制副溶血性弧菌的食品污染,提高食品安全水平。

本实验室从 2011 年开始进行包括副溶血性弧菌在内的食源性致病菌食品污染全国调查和风险识别。在这项调查的基础上,副溶血性弧菌的遗传多样性、生存生长机制以及致病机制的研究将更进一步的深入下去。

参考文献

- [1] Su Y C, Liu C C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 24: 549-558
- [2] 严纪文,马聪,朱海明,等.2003~2005 年广东省水产品中副溶血性弧菌的主动监测及其基因指纹图谱库的建立[J].中国卫生检验杂志,2006,16(4):387-391
YAN Ji-wen, MA Cong, ZHU Hai-ming, et al. Establishment of Fingerprinting Database and Surveillance on Marine Products for *Vibrio parahaemolyticus* in Guangdong from 2003 to 2005 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(4): 387-391
- [3] Duan J, Su Y C. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays [J]. Journal of Food Science, 2005, 70(1): M58-M63
- [4] Fuenzalida L, Armijo L, Zabala B, et al. *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated during investigation of the summer 2006 seafood related diarrhea outbreaks in two regions of Chile [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 117(3): 270-275
- [5] 李晓艳,吕碧锋,潘海晖,等.529 例副溶血弧菌食物中毒分析[J].现代医药卫生,2008,24(5):778
LI Xiao-yan, LV Bi-feng, PAN Hai-hui, et al. Analysis on 529 Cases of *Vibrio parahaemolyticus*-associated Food Poisoning [J]. Xian Dai Yi Yao Wei Sheng, 2008, 24(5): 778
- [6] 黎薇,方伟,柯昌文,等.广东省 2003~2008 年副溶血性弧菌血清学分型研究[J].中国病原生物学杂志, 2009, 4(7): 485-488
LI Wei, FANG Wei, KE Chang-wen, et al. Study on the Serotype of *Vibrio parahaemolyticus* Isolates during 2003-2008 in Guangdong Province [J]. Journal of Pathogen Biology, 2009, 4(7): 485-488
- [7] Chen M, Guo D, W H, et al. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 159(2): 122-129
- [8] Makuping R P, Lavilla-Pitogo C R, Romalde J L, et al. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* strains [C]// Disease in Asian Aquaculture VI. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, 2008: 451-468
- [9] Ye Y W, Wu Q P, Yao L, et al. Analysis of a consensus fragment in ERIC-PCR fingerprinting of *Enterobacter sakazakii* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 132: 172-175
- [10] 郑扬云,吴清平,吴克刚,等.空肠弯曲菌分离株 ERIC-PCR 分型和生化分型的比较研究[J].现代食品科技,2013, 29(8):1843-1850
ZHENG Yang-yun, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Comparison of the Typing Methods of ERIC-PCR and Biochemical for *Campylobacter jejuni* Isolates [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1843-1850
- [11] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(24): 6823-6831
- [12] Chen M, Wu Q P, Zhang J M, et al. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail-level ready-to-eat foods in South China [J]. Food Control, 2014, 38: 1-7
- [13] Han H H, Wong H C, Kan B, et al. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the 'pandemic group' [J]. BMC Genomics, 2008, 9: 570, doi: 10.1186/1471-2164-9-570
- [14] Raimondi F, Kao J P Y, Fiorentini C, et al. Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in in vitro systems [J]. Infection and Immunity, 2000, 68(6): 3180-3185