DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2012.02.016

·论 著·

深圳市 2010 年食品中副溶血弧菌检测分析

贺连华,陈妙玲,吴平芳,吕东月,林爱红

摘要:目的 了解深圳地区 2010 年食品中副溶血弧菌血清型及在食品中的分布状况、生物学特征。 **方法** 对食品中检出的 159 株副溶血弧菌进行血清学分型,并对 14 株 O4 群副溶血弧菌进行脉冲场凝胶电泳分子分型和毒力基因 TLH、TDH、TRH 检测。 **结果** 159 株副溶血弧菌共分 46 个血清型,血清型以 O2:K28 最多,占 6.67%,14 株 O4 群副溶血弧菌分子分型相似性均在 80%以下,菌株谱型差异较大。其毒力基因 TLH+、TDH-、TRH-。 **结论** 食品中分离出的副溶血弧菌菌型非常分散,食品之间存在严重交叉污染,应加强食品卫生监督及流通环节的规范化管理。

关键词: 副溶血弧菌;血清型;分子分型

中图分类号: R378.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2012)2-198-03

Detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from food in Shenzhen city in 2010. HE Lian-hua, CHEN Miao-ling, WU Ping-fang, et al. (*Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong, P. R. China*)

Abstract: **Objective** To study the serotype, distribution and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food in Shenzhen city in 2010 and provide evidence for the prevention and control of diarrheal diseases caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** 159 Vibrio parahaemolyticus strains isolated from food were sero-typed, and 14 *Vibrio parahaemolyticus* strains classified in group O4 were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and all of three virulence genes (TLH, TDH and TRH) were detected by real-time PCR. **Results** 159 *Vibrio parahaemolyticus* strains belonged to 46 serotypes, in which O2:K28 accounted for 6.67% being the predonimating seroypes. The similarity of 14 *Vibrio parahaemolyticus* strains (O4) was less than 80% and with significant difference in strain maps. And the virulence genes were TLH+, TDH-, TRH-. **Conclusion** The patterns of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food are scattered, and food has serious cross-contamination. Food supervision should be strengthened to guarantee the food safety.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; PFGE

副溶血弧菌是一种广泛分布于世界地区的一种革兰氏阴性嗜盐杆菌,是引起食源性疾病的主要病原菌之一,尤其是沿海地区。副溶血弧菌的高感染率与其在环境中的广泛分布及产生的多种致病因子息息相关。多年来深圳市食品污染物致病菌检测及感染性腹泻病原谱的哨点监测结果显示,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 67.1%[1]。致病株主要分布在几个血清型,其中以 O3:K6 最多,其构成比为 67.2%。TDH 和 TRH 两个毒力基因副溶血弧菌临床分离株主要是 tdh+trh- 菌株,占 93%,少数菌株为 tdh+trh+ 和 tdh-trh- 菌株[2]。本研究应用血清学分型、脉冲场电泳(PFGE)技术和改良分子信标的荧光 PCR 技术对 2010 年深圳市 CDC 和 7 区 CDC 在食品中分离的 159 株副溶血弧菌进行血清学和生物学特性的分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株 159 株副溶血弧菌来自深圳市 CDC 和 7 区 CDC 上送菌株,均为食品中分离株。所有菌株都按照国家标准方法《食品卫生微生物学检验》(GB4789.7-2008)进行鉴定,并用日本生研株式会社诊断学清进行分型鉴定。分子量参考标准株为 Pulse Net 中使用的沙门菌 H9812[6]。

1.1.2 实验仪器 脉冲场电泳仪为 CHEF DR-Ⅲ(Bio-Rad),凝胶成像系统为 Bio-Rad Quantity One(4.4.0)系统和 Bionmerics 5.0 分析软件,Stratagene MX3005 荧光定量 PCR 仪。

1.1.3 实验试剂 SeaKem Gold 胶(Cambraex Bio Science Rockland)、蛋白酶 K(Merck)、限制性内切酶 StifI(NEB)和 XbaI(NEB)。细菌 DNA 基因提取试剂盒(QIAGEN 公司)。副溶血弧菌诊断血清购自日本生研公司。10× buffer、dNTP、$MgCl_2$ 和 UTaq 酶均购自 TAKARA 公司。引物和探针均由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 血清学分型 按照日本生研株式会社诊断学清凝集说明书进行。

1.2.2 PFGE 分型 参照美国疾病预防控制中心推荐的霍乱弧菌脉冲场凝胶电泳标准方法,对 14 株 O4 群副溶血弧菌(5 株 O4:K42、2 株 O4:K8、2 株 O4:K63、3 株 O4:KUT、1 株 O4:K33、1 株 O4:K9)进行 PFGE 分型。包括如下步骤:胶块的制备、裂解、洗涤。酶切(副溶血弧菌用 StifⅠ内切酶进行酶切,标准菌株 H9812

基金项目:深圳市科技计划项目(201003123)

作者单位:深圳市疾病预防控制中心,广东 深圳 518055

作者简介:贺连华(1967-),女,副主任技师,主要从事食品微生物检验。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用内切酶 Xba Ⅰ进行酶切）、电泳。电泳程序：起始转换时间为 10s，最终转换时间为 35s，电泳时间为 19h。电泳结束后，将胶块用 EB 染色，纯水洗涤，通过凝胶成像拍照，最后采用 Bionmerics 5.0 分析软件对 DNA 指纹图谱进行聚类分析，量化不同菌株之间基因水平的亲缘关系。

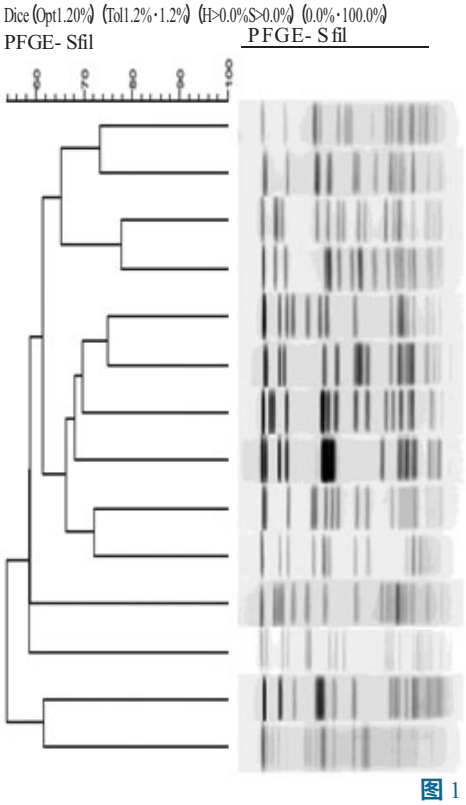
1.2.3　副溶血弧菌毒力基因检测　取增菌液 1ml，12000r/min 离心 5min，弃上清，加入 200μ l 灭菌纯水悬浮，置于 100℃煮沸 5min，12000r/min 离心 2min，保留上清备用。根据 GenBank 公布的副溶血弧菌 tlh 和 tdh 基因设计引物和探针。tlh 引物序列为：tlh- F：AC AAAATGTCGTGCGCTAAG，tlh- R：GAACAAGGCGTG ACGAATAA，tlh- Probe：FAM- CGCGCCTTGTTCGAGA CGCTAACTTCTGCGCG- DABCYL。tdh 引物和探针序列为：tdh- F：AAACATTTGCCTTTGAGCTTCCA，tdh- R：CTCGAACAACAAACAATATCTCATCAG，Tdh- Probe：FAM- CCGGGGTGTCCCTTTTCCTGCCCCCGG- DAB-CYL。参照 Davis 等[7]报道的 trh 引物和探针序列，trh-F：GCCAAGTGTAACGTATTTGGATGA，trh- R：TGCCC ATTTCCGCTCTCA，trh- Probe：FAM- ACGCCAGAATAT TTCGTCAATGTCGAA GC- BHQ1。检测 tdh、trh 和 tlh 基因的 PCR 反应总体系均为 25μ l，内含 5μ l DNA 模板，2.5μ l 10× buffer，0.25mmol/L dNTP，1.5mmol/L Mgcl2，1 UTaq 酶，25pmol 引物，25pmol 探针。实时 PCR 反应参数为：95℃预变性 3min；95℃变性 20s，58℃退火 1min，72℃延伸 15s，40 个循环。所有荧光 PCR 检测均由使用德国 strtagene 公司生产的 MX3005 仪器采用退火阶段检测 FAM 通道的荧光。

2　结果

2.1　血清学分型　159 株分离株经过日本生研血清诊断分析，分属 O1- O8 群、O10- O11 群，共 46 个血清型，其中 O1 群有 9 个血清型、O2 群有 4 个血清型、O3 群有 8 个血清型、O4 群有 8 个血清型、O5 群有 3 个血清型、O6 群有 1 个血清型、O7 群有 1 个血清型、O8 群有 2 个血清型、O10 群有 5 个血清型、O11 群有 5 个血清型。如图 3 所示，O+：KUT 血清型表示 O 抗原凝集能分群，K 抗原不凝集，此种类型的菌株占较高比例，为 21.85%。即使用酸处理，还有部分不能分到型。能分型的 10 种主要血清型分别是 10 株 O2:K28、9 株 O2:K3、9 株 O5:K17、7 株 O4:K42、6 株 O4:K34、6 株 O10:K24、6 株 O1:K32、3 株 O1:K19、3 株 O1:K33、3 株 O3:K45。另外 36 种血清型各占 1 株或 2 株。

2.2　PFGE 分子分型　14 株（O4 群）副溶血弧菌的电泳图谱用软件 Bio Numerics 进行分析，分属 14 种 PFGE 图谱，此结果表明，即使血清型别相同的菌株，基因型差异也较大，如图 1 所示，编号为 0037、0016、0017、0011、0024 的 5 株 O4:K42 血清型菌株相似性均在 80%以下，存在较大基因型差异。

2.3　毒力基因检测　对 14 株 O4 群副溶血弧菌菌株携带的耐热溶血素基因 tdh、耐热相关溶血素基因 trh 和不耐热性溶血毒素 tlh 基因进行荧光 PCR 检测。结



SZ056	FR10 016	中国	深圳	食品	多宝鱼	2010 年	O4 :K42	0037
SZ053	FR10 038	中国	深圳	食品	福寿鱼	2010 年	O4 :K8	0036
SZ046	FR08 016	中国	深圳	食品	生蚝	2008 年	O4 :K42	0016
SZ048	FR08 018	中国	深圳	食品	生蚝	2008 年	O4 :K42	0017
SZ049	FR08 019	中国	深圳	食品	生蚝	2008 年	O4 :K36	0008
SZ051	FR09 019	中国	深圳	食品	三文鱼	2009 年	O4 :K42	0011
SZ052	FR09 006	中国	深圳	食品	生蚝	2010 年	O4 :K/	0013
SZ054	FR10 001	中国	深圳	食品	猪肉	2010 年	O4 :K 混Ⅱ	0021
SZ047	FR10 008	中国	深圳	食品	生蚝	2007 年	O4 :K33	0015
SZ057	FR07 007	中国	深圳	食品	鲢鱼	2010 年	O4 :K42	0024
SZ018	FR10 019	中国	深圳	食品	福寿鱼	2010 年	O4 :K8	0034
SZ035	FR10 037	中国	深圳	食品	生蚝	2008 年	O4 :K/	0041
SZ050	FR08 023	中国	深圳	食品	生蚝	2008 年	O4 :K63	0027
SZ055	FR10 010	中国	深圳	食品	猪贤	2010 年	O4 :K9	0002

图 1　14 株 O4 群副溶血弧菌的 PFGE 图谱

Fig 1　PFGE patterns of 14 *Vibrio parahaemolyticus* strains (O4)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

果 14 株副溶血弧菌均为 tlh+tdh- trh-，如图 3，tlh 基因检出率为 100%，提示样本只进行 tdh 和 trh 基因检测，都会出现漏检，尤其是来自环境的样本。

3 讨论

针对目前副溶血弧菌如此高的感染率，采取有效的检验技术，及时对传染源进行检测和控制，有利于预防和减少副溶血弧菌引起的腹泻。目前副溶血弧菌的检测方法主要是分离培养、生化鉴定、血清分型传统技术，荧光 PCR 技术主要应用在对 tdh、trh 两个主要毒力基因检测中，针对 tlh 基因检测少见报道。有研究认为 tlh 是有广泛种属特异性的基因，副溶血弧菌产生的不耐热性溶血毒素（tlh）是其主要的毒素之一[8]，提示样本只进行 tdh 和 trh 基因检测，都会漏检，尤其是来自环境的样本。副溶血弧菌均携带 tlh 基因和国外文献报道 trh 来自临床及环境中副溶血弧菌检出率均不高与本实验检测结果相吻合。近几年深圳地区腹泻病副溶血弧菌临床分离株主要是 tdh+、trh- 菌株，占 93%，少数菌株为 tdh 和 trh 双阳性和 tdh 和 trh 双阴性菌株[9]。日本学者研究来自海产品及海水的副溶血弧菌菌株仅 1%tdh 阳性，提示 tdh 在环境来源的副溶血弧菌中检出率不高[10]。tdh 基因家族广泛存在于人类致病性弧菌中，如大多数霍利斯弧菌，某些拟态弧菌，非 O1 群霍乱弧菌等，tdh 相关基因同源性约 93%～96%，提示 tdh 基因检测并不一定是副溶血弧菌[11,12]。PFGE 分子分型是从基因水平对菌株进行型别区分，该方法被认为是细菌分子分型的金标准，可以快速将来自食品和病人的细菌 PFGE 结果进行比较，追查相关食品源头。PFGE 分子分型聚类分析显示从食品中分离的副溶血弧菌相同血清型菌株之间图谱均存在明显差异，显示污染食品分离株则多为遗传不相关菌株。感染性腹泻病人中分离出的主要血清型是 O3:K6、其次是 O4:K8、O1:K5 和 O3:K29，优势菌非常明显。与食品中分离的主要血清型截然不同，基本不相关。2010 年深圳市 CDC 和 7 区 CDC 在食品中共分离出 159 株副溶血弧菌，分别来自下列 5 类生鲜食品：淡水鱼 49 株、海水鱼 39 株、软体类 34 株、蓄肉类 24 株、禽肉类 13 株。经过血清学分析，共计 46 个血清型，型别多而杂，而且 O 抗原凝集、K 抗原不凝集的占较高比例，即使用酸处理，还有部分不能分到型。另外，从环境中分离的 O3:K6 型，到目前为止没发现有携带 TDH 基因菌株，而且从环境中分离副溶血弧菌非常容易，一份样品有时可分离到几个型别的菌株，但诊断血清价格昂贵，工作量大。因此发现环境中副溶血弧菌与食物中毒病人相关联的菌株，需要改进检验方法，扩大可疑菌落鉴定范围或从菌株基因变异方面加以研究。

参考文献：

[1] Lan QX，HU QH，Shi XL，et al. Analysis on PFGE molecular subtyping of Vibro parahaemolyticus strains [J]. Chin.J Pub Heal，2007，23（10）：1183-1185.（In Chinese）
（兰全学，扈庆华，石晓路，等. 副溶血弧菌脉冲场凝胶电泳技术分子分型分析 [J]. 中国公共卫生，2007，23（10）：1183-1185）

[2] Zeng ZP，Liao RF，Li HY，et al. Analysis of thermolabile hemolysin genotypes of Vibrio parahaemolyticus [J]. Chin J Heal Lab Technol，2009，19（6）：1338-1339.（In Chinese）
（曾转萍，廖日房，李红玉，等. 副溶血弧菌 TLH 基因检测 [J]. 中国卫生检验杂志，2009，19（6）：1338-1339）

[3] Deng ZA，Li XQ，Li ZH，et al. Identification and Genotyping of Clostridium perfringens lsolated from the Food samples [J]. J Trop Med，2006，6（6）：682-690.（in Chinese）
（邓志爱，李孝权，李钊华，等. 食品中产气荚膜梭菌的分离鉴定与基因分型 [J]. 热带医学杂志，2006，6（6）：682-690）

[4] Zhao YH，Fu WL，Chen M，et al. Identification of Clostridium perfringens Causing Human Disease by Multiplex PCR [J]. Chin J Nosocomiol，2006，16（11）：1310-1312.（In Chinese）
（赵渝徽，府伟灵，陈鸣，等. 应用多重 PCR 鉴定对人致病的产气荚膜梭菌毒素 [J]. 中华医院感染学杂志，2006，16（11）：1310-1312）

[5] He LH，Hu QH，Shi XL，et al. Rapid Detection of *E.coli* O157：H7 by using modified beacons and real-time PCR [J]. China Trop Med，2006，5（6）：761-762.（In Chinese）
（贺连华，扈庆华，石晓路，等. 改良分子信标实时 PCR 快速检测大肠杆菌 O157：H7 [J]. 中国热带医学，2006，5（6）：761-762）

[6] Hunter SB，Vauterin P，Lambert-Fair M，et al. Establishment of universal size standard，starin for use with the pulse net standarized pulse-field gel electrophoresis protocols：converting the national databases to the new size standard [J]. J Clin Microbiol，2005，43（3）：1045-1050.

[7] 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]. J Food Prot，2004，67（5）：1005-1008.

[8] Zhang W，Pan JC，Meng DM，et al. Molecular typing on Vibrio parahaemolyticus isolates from Hangzhou [J]. Chin J Epidemiol，2006，27（4）：343-346.（In Chinese）
（张蔚，潘劲草，孟东梅，等. 杭州地区 2000~2002 年副溶血弧菌的分子分型研究 [J]. 流行病学杂志，2006，27（4）：343-346）

[9] Wang Y，Hu QH，Mu J，et al. Etiologic and molecular characteristics of Vibrio parahaemolyticus straihs isolated from diarrheal patients in Shenzhen，in 2007-2008 [J]. Chin J Epidemiol，2010，31（1）：51-55.（In Chinese）
（王艺，扈庆华，牟瑾，等. 深圳市 2007~2008 年腹泻病副溶血弧菌监测及分析特性分析 [J]. 流行病学杂志，2010，31（1）：51-55）

[10] Tenover FC，Arbeit RD，Goering RV，et al. Interpreting chromosomal DNA restrition patterns produced by pulsed-fidel gel electrophoresis：criteria for bacterial strains typing [J]. J Clin Microbial，1995，33（9）：2233-2239.

[11] Okura M，Osawa R，Lguchi A，et al. Genorypic analyses of Vibrio parahaemolyticus and development of a pandemic group-specific muftiplex PCR assay [J]. J Clin Microbiol，2003，41（10）：4676-4682.

[12] Chowdhury NR，Chakraborty S，Ramamurthy T，et al. Molecular evidence of clonal Vibrio parahhaemolyticus pandemic strins [J]. Emerg Infect Dis，2000，6（6）：631-636.

收稿日期：2011-09-30 编辑：符式刚

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net