

• 论 著 •

临床副溶血弧菌血清型及基因分型特征研究

印晓静, 徐 薇[△], 韩东升

(江苏省苏北人民医院医学院医学检验科, 江苏扬州 225001)

摘要:目的 了解本地区腹泻患者中副溶血弧菌(VP)血清型及分子分型特征,为 VP 感染的防控提供科学参考。方法 对 2010~2014 年收集到的 62 菌株进行血清型分型;采用 PCR 检测溶血素相关毒力基因(tdh 和 trh);利用多位点序列分型(MLST)进行分子分型。结果 62 株菌株分属 7 种不同的血清型,O3:K6 型居首,共 46 株,占 74.19%,其次是 O4:K68(6 株)。毒力相关基因检测发现 tdh 阳性株占 95.16%(59 株),而 trh 阳性者仅 3 株。分子分型确定 7 种 STs,其中 ST3 型占 85.50%(53 株),其他 ST 型散在分布。结论 O3:K6 血清型 VP 是本地区最主要的分离株,大多携带 tdh 毒力基因,ST3 型是优势流行型别。

关键词:副溶血弧菌; 毒力基因; 血清型; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1028-02

Serotyping and genotyping study of clinical *Vibrio parahaemolyticus**Yin Xiaojing, Xu Wei[△], Han Dongsheng

(Department of Laboratory Medicine, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou, Jiangsu 225001, China)

Abstract: Objective To study the distribution and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*(VP) in patients with acute diarrhea, and provide a scientific basis for the prevention and control of VP infection. **Methods** From 2010 to 2014, 62 VP isolates were collected from patients with acute diarrhea, for serotyping and virulence gene (tdh and trh) detection of VP. Molecular characteristics analysis was carried out by using multi-locus sequence typing (MLST). **Results** 7 different serotypes were found from the 62 isolates. O3:K6 was the most common serotype of VP, accounting for 74.19% (46 isolates), followed by O4:K68 (6 isolates). Tdh gene was the mainly virulence gene, with a percentage of 95.16% (59 isolates), only three isolates were trh positive. 7 STs were found through MLST analysis of 62 VP isolates, among which, ST3 was the most important type, accounted for 85.50% (53 isolates). **Conclusion** O3:K6 serotype VP was the most prevalent type. Tdh gene is the most important virulence gene of VP. ST3 was the dominant epidemic type.

Key words: vibrio parahaemolyticus; serotyping; virulence; genotyping

副溶血弧菌(VP)是一种在世界沿海国家和地区流行较为广泛的一种食源性致病菌,主要导致人类的急性腹泻。VP 感染威胁着公众健康并为患者带来了经济负担。据统计,在美国,每年平均有 34 664(18 260~58 027)例 VP 感染事件,病死率约 0.9%^[1]。在日本、中国台湾和越南等地,大约一半的食源性暴发事件由 VP 引起^[2-3]。我国的食源性疾病监测网数据显示,VP 感染暴发事件居微生物食源性疾病爆发的首位^[4]。本研究收集了临床腹泻患者的粪便标本,开展 VP 的血清型及基因分型特征研究,通过血清分型、毒力基因检测及多位点序列分型(MLST),探讨临床 VP 的流行特点,为防控 VP 感染提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 标本来源于本地区 2010~2014 年的急性腹泻患者,纳入标准:每日排便不少于 3 次,且大便性状有改变(呈稀便、水样便、黏液/脓液便或脓血便等),病程不超过 14 d。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离及鉴定 标本采集后直接接种于碱性蛋白胨水进行增菌,VP 的分离培养与鉴定按《全国临床检验操作规程》^[5]进行。采用法国生物梅里埃公司产品 VITEK2 Compact 微生物鉴定仪进行细菌鉴定。

1.2.2 血清分型 购买日本生研株式会社生产的 VPO、K 抗原分型诊断血清,用玻片凝集法进行 O、K 血清型鉴定,具体操作步骤严格按照操作说明书。

1.2.3 毒力基因检测 将分离鉴定的 VP 菌株,纯培养后制备成菌悬液,煮沸法提取菌株 DNA 模板,毒力基因 tdh 和 trh 的引物序列及反应条件参考以往报道^[6]。

1.2.4 MLST 62 株临床来源的 VP 进行 MLST 分析。实验方法参照 pubMLST 数据库(<http://pubmlst.org/vparahaemolyticus/>)提供的标准进行:对 VP 的 7 个管家基因 dnaE、gyrB、recA、dtdS、pntA、pyrC 和 tnaA 进行 PCR 扩增,产物测序结果与 pubMLST 数据库进行比对,获得各管家基因位点的等位基因数值,并形成相应的等位基因谱,判断其序列型(ST)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

2 结果

2.1 血清型分布 62 株 VP 分为 7 种不同的血清型,以 O3:K6 为主,有 46 株,占 74.19%,其次是 O4:K68(6 株),O1:K56(3 株)和 OUT:KUT(3 株);2 株为 O4:KUT;O1:KUT 和 O3:KUT 各 1 株,见表 1。OUT 指 O 血清型未能鉴定;KUT 指 K 血清型未能鉴定。

2.2 毒力相关基因分布 对 62 株 VP 进行 tdh 和 trh 毒力基因

扩增 59 株(95.16%)分离菌携带 tdh 基因,而 trh 阳性株仅 3 株。具体组合基因型表现为:tdh(+)trh(-)菌株 56 株,tdh(+)trh(+)菌株 3 株,tdh(-)trh(-)菌株 3 株。见表 1。

表 1 62 株 VP 血清型及毒力相关基因分布情况(n)				
血清型	n	毒力相关基因		
		tdh(+)trh(-)	tdh(+)trh(+)	tdh(-)trh(-)
O3 : K6	46	44	1	1
O4 : K68	6	6	0	0
O1 : K56	3	3	0	0
O1 : KUT	1	1	0	0
O3 : KUT	1	0	1	0
O4 : KUT	2	1	1	0
OUT : KUT	3	1	0	2
总计	62	56	3	3

2.3 MLST 62 株 VP 分属于 7 种 STs,其中 ST3 共 53 株,占 85.50%,ST8 3 株,ST120 2 株,其他 4 种 ST 型(ST69、ST527、ST332 和 ST417)各 1 株。见表 2。

表 2 62 株 VP MLST 分析(n)								
序列型	n	等位基因数						
		dnaE	gyrB	recA	dtdS	pntA	pyrC	tnaA
ST3	53	3	4	19	4	29	4	22
ST8	3	28	4	82	88	63	69	1
ST120	2	60	108	86	98	18	45	51
ST69	1	43	41	31	42	37	40	33
ST527	1	43	41	107	42	37	40	33
ST332	1	14	30	141	78	4	37	13
ST417	1	3	111	167	188	116	167	33

3 讨 论

VP 是我国东南沿海地区一个重要的食源性致病菌^[7]。目前,VP 共有约 75 种血清型与人类腹泻有关。1996 年 2 月以来,一种新的具有特种基因型别的 O3 : K6 血清型菌株在亚洲、美洲、非洲和欧洲的国家 and 地区发生大规模的洲际流行^[8]。在我国,O3 : K6 型菌株也是最主要的血清克隆群^[7]。本研究共发现 7 种血清型,其中 O3 : K6 型是最重要的血清型,占 74.19%;其次是 O4 : K68 (6 株)和 O1 : K56 (3 株),和许多国家流行的血清型基本一致。本研究中 3 株菌(OUT : KUT)未能鉴定出 O 和(或)K 血清型,可能与菌株本身在宿主体内容易发生血清抗原转变有关,这些菌株需要进一步的研究来明确其基因分型特征。

tdh 被认为是 VP 的最主要的毒力因子,本研究中分离到的绝大多数 VP 菌株表现为 tdh 阳性和 trh 阴性,只有 3 株同时携带 tdh 和 trh 基因,这说明了 tdh 是本地区 VP 最主要的致病因子。同时,还发现 3 株菌均未携带 tdh 和 trh 基因,这种现象在其他研究结果中也有报道^[9],所以推测,VP 致病性除了与 tdh 和 trh 有关外,这些表现为两者均阴性的菌株还可能存在的其他独立致病因子。但是,不能排除患者的体内同时存

在的其他致病性微生物的混合感染,而这些其他微生物才是真正致病的元凶,在被检出的情况下,这些本不致病的 VP 菌株误被当成了致病菌。所以,临床标本中检测到的 tdh 阴性和 trh 阴性的菌株到底是不是真正的致病菌以及其的致病性强度还有待进一步分析。

随着分子生物学检测技术的发展,多种细菌分型技术如血清学分型、噬菌体分型及脉冲场凝胶电泳(PFGE)等被广泛应用于副溶血性弧菌的分型研究,在 VP 的疾病预防和暴发的防控中起着非常重要的作用。MLST 是一种较新的分子分型方法,以细菌基因组中管家基因的序列分析为基础,具有较高的分辨率和识别度,能更好地理解菌株间的遗传亲缘关系以及基因水平转移对细菌进化的重要性。本研究对 62 株 VP 进行了 MLST 分析,共分出 7 种 STs,其中 ST3 共 53 株,占 85.50%,是优势型别,但同时又存在着多种亚型。

综上所述,本研究通过开展本地区急性腹泻人群中 VP 的研究,获得了 VP 血清型构成情况;同时通过开展毒力相关基因检测及 MLST 分子分型研究,为 VP 的致病机制及分子流行病学研究提供了科学数据支持,为更好地做到 VP 感染性腹泻的防控和预警提供了重要的参考依据。

参考文献

[1] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. Foodborne illness acquired in the United States——major pathogens[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(1): 7-15.

[2] Chowdhury A, Ishibashi M, Thiem VD, et al. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999 [J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(4): 319-327.

[3] Bhuiyan NA, 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.

[4] 沈志英, 高文洁, 王恒辉, 等. 2001~2009 年细菌性食物中毒病原菌检测结果分析[J]. 现代预防医学, 2011, 38(1): 30-31.

[5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006.

[6] Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, 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.

[7] Li Y, Xie X, Shi X, et al. *Vibrio parahaemolyticus*, Southern Coastal Region of China, 2007—2012[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(4): 685-688.

[8] 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.

[9] 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]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3150-3155.