

## 副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 大流行克隆的溯源

徐苗苗<sup>1,2</sup> 刘静雯<sup>1,2\*</sup>

(1. 集美大学 食品与生物工程学院 福建 厦门 361021)

(2. 福建省高校食品微生物与酶工程研究中心 福建 厦门 361021)

**摘要：**副溶血性弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性嗜盐性海洋细菌。1950 年从日本一次暴发性食物中毒中首次分离发现。作为一种食源性人鱼共患致病菌，副溶血性弧菌在全球的河口、海洋和沿海广泛传播，由其引起的食物中毒已跃居其它病原菌之首。副溶血性弧菌在进化过程中通过基因重组和基因水平转移逐渐改善其对环境的适应性，因而与其它所有致病微生物相比，副溶血性弧菌的基因型和血清型都具有高度的多样性。本文就副溶血性弧菌，特别是 1996 年后在世界范围内出现的 O3:K6 新血清型流行株(形成所谓的 O3:K6 大流行克隆 Pandemic clone)的发现及流行特征、变异分子流行病学特征、在我国的分布及研究进展进行综述，以期 O3:K6 大流行克隆的溯源提供更多依据。

**关键词：**副溶血性弧菌，O3:K6 流行株，发现及分布，变异分子流行病学特征，溯源

## Traceability of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 serovar clone

XU Miao-Miao<sup>1,2</sup> LIU Jing-Wen<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021, China)

(2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen, Fujian 361021, China)

**Abstract:** *Vibrio parahaemolyticus*, a gram-negative halophilic bacterium, first identified as a cause of food-borne illness in Japan in 1950, is widely disseminated in estuarine, marine, and coastal environments throughout the world. As one of major pathogens, *V. parahaemolyticus* can cause bacterial food poisoning and threaten the public health. *V. parahaemolyticus* isolates are multiple diverse genotype and serotypes faster adapting to the versatile environment. Molecular genetic analysis showed that the genetic diversity may be acquired as a result of gene recombination or horizontal gene transfer. This paper reviewed the finding, distribution, epidemiological characteristics and mutation molecular epidemiological characteristics of *V. parahaemolyticus*, particularly the global dissemination of pandemic serovar O3:K6 clone, so as to provide evidences

基金项目：国家海洋公益性行业专项项目(No. 201305027)；福建省食品微生物与酶工程重点实验室开放基金项目(No. M20130910)

\*通讯作者：Tel：86-592-6180470；✉：ljwsbch@163.com

收稿日期：2014-01-08；接受日期：2014-05-20；优先数字出版日期(www.cnki.net)：2014-05-23

for the traceability of the isolates.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*, Pandemic O3:K6 clone, Finding and distribution, Mutation molecular epidemiological characteristics, Traceability

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, 简称 VP), 隶属弧菌科的弧菌属, 是一种革兰氏阴性嗜盐性人鱼共患致病菌。广泛分布在近海岸的海水、海底沉积物、海产品及腌制食品中。副溶血性弧菌食物中毒与进食含有该菌的食物有关, 生食或食入未煮熟的受到污染的海产品或腌制食品是其主要传播途径。副溶血性弧菌的致病性主要来自其耐热性直接溶血素(TDH)和耐热性相关溶血素(TRH), 分别由 *tdh* 和 *trh* 基因编码合成。临床中分离自食物中毒患者的副溶血性弧菌, 多数能产生 TDH 或者 TRH, 或者两者同时产生; 然而环境中分离的副溶血性弧菌则几乎没有这些特性<sup>[1-2]</sup>。因此, 将拥有毒力基因 *tdh* 和/或 *trh* 的副溶血性弧菌称为致病株, 不拥有这两个基因的菌株称为非致病株。20 世纪 90 年代末, 携带有毒力基因 *tdh* 的 O3:K6 大流行克隆出现, 导致许多国家由该菌引起的感染大幅度增加, 这也使之成为研究的热点。本文从 O3:K6 大流行克隆的发现及流行特征, 变异分子流行病学特征, 在我国的分布、流行及研究进展等角度对其进行综述, 以期为大流行克隆的溯源提供更多依据。

## 1 副溶血性弧菌的发现历程及传播

### 1.1 副溶血性弧菌的发现及危害

日本是最早发现副溶血性弧菌的国家, 早在 1950 年, 以日本大阪府为中心的泉州地方发生了第二次世界大战以来最严重的集体性食物中毒事件, 共有 272 名患者中毒, 其中死亡 20 人, 通过对中毒原因进行调查分析, 最后从小沙丁鱼干样品中分离出了一种新种细菌, 即本次食物中毒的致病菌——肠炎弧菌。该菌在外型上与弧菌的模式株霍乱弧菌差异甚大, 因此藤原并没有把它归为弧菌属范畴而是归类为巴斯德菌属, 并在 1951 年将其命名为 *Pasteurella parahaemolyticus* 并发表<sup>[3]</sup>。随后,

不断有研究者从不同的食物中毒事件中分离出该致病菌, 并经多次更名后, 最终于 1963 年, 日本国立预防卫生研究所(今日本国立传染病研究所)的福见秀雄和坂崎利一证明了此种细菌应属于弧菌属, 将学名改定为 *Vibrio parahaemolyticus*, 同时也将此种细菌的日文名称改为肠炎弧菌(日文: 腸炎ビブリオ)。1966 年国际弧菌命名委员会在暂行规定中将致病性嗜盐菌列入弧菌属内, 正式命名为副溶血性弧菌, 沿用至今<sup>[4]</sup>。

副溶血性弧菌因较强的致病性而引起世界范围内研究者的关注, 仅仅在 1960–1970 年间, 印度、泰国、马来西亚、菲律宾、越南、澳大利亚、多哥、墨西哥、巴拿马、英国、美国等国家均首次发现该菌的存在<sup>[5]</sup>。随后, 由该菌引起的食物中毒相继被报道。我国上海自 1957 年首次报道该病原菌后, 每年夏季都会从食物中毒或者痢疾患者粪便中分离一种新的细菌, 怀疑此菌为致病菌<sup>[6]</sup>。1958 年叶自儒等从一名吃烤鹅导致食物中毒的患者粪便中、死亡病人腹内物、烤鹅及生肌鹅肉、肝脏、骨髓中成功分离出了这种致病菌, 并确定其为嗜盐菌<sup>[7]</sup>。这是我国首次正式报道副溶血性弧菌存在。其后由该菌引起的食物中毒事件也多有报道<sup>[8-9]</sup>。根据上海市防疫站报告, 1961–1962 年上海市由该菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒总件数的 83.8%<sup>[10]</sup>。据国家食源性疾病监控网络数据显示, 近年来由副溶血性弧菌引起的食物中毒的食源性比例为 68.0%, 居我国沿海地区细菌性食物中毒之首<sup>[11]</sup>。

### 1.2 我国首株分离株的形态及生理生化特性

我国于 1959–1961 年通过对期间暴发的 7 起急性下痢肠炎食物中毒的患者进行中毒原因分析, 以 253 名患者的粪便和有关食物作为研究对象, 首次成功分离出 102 株不知名的肠道菌, 其中在粪便的初次分离中获得了 22 株, 并对其进行了培养和初

步鉴定。鉴定结果显示,该菌革兰氏染色阴性,长约 0.3–0.5  $\mu\text{m}$ , 兼性厌氧菌, 最适 pH 为 7.4–7.6, 适宜温度 32–37  $^{\circ}\text{C}$ 。能分解葡萄糖、麦芽糖、甘露醇产酸不产气, 不能分解乳糖、蔗糖。通过活菌毒力实验证明该菌对小鼠有明显的致病性。该菌的这些特征与日本藤野恒三郎和潼川氏等报道的嗜盐菌极其相似, 仅在柠檬酸盐、靛基蓝和明胶液化等生化特性上稍有不同<sup>[12]</sup>。

### 1.3 传播途径

副溶血性弧菌自 1950 年被首次发现并被认为是引起食物中毒最主要的致病菌以来, 由该菌引起的食物中毒呈逐年上升的趋势。副溶血性弧菌的最适生长温度为 37  $^{\circ}\text{C}$ , 因此夏秋季成为该菌食物中毒的高发季节。传统的观点认为由该菌引发的食物中毒多与食用海产品及腌渍的食物有关。但最新的研究发现并非如此, 事实上, 携带有该致病菌的食品可以通过交叉污染从而引发食物中毒。即在从销售场所到餐桌的流通过程中, 副溶血性弧菌不仅可以通过海产品, 而且可通过污染淡水产品及其他没有携带该菌的食品以及器具进行传播。水产品产地/销售/加工场所、超市、菜市场、宾馆饭店成为副溶血性弧菌进行交叉污染的主要场所。正因为如此, 这些地方也成为引发食物中毒及食源性疾病发生的关键场所。与此同时, 在对副溶血性弧菌食物中毒进行溯源分析时, 这些场所也必然成为溯源渠道之一。但就不同国界的副溶血性弧菌是如何进行传播的, 相关的研究却很少。我国由国家海洋局第一海洋研究所建立的“中国外来海洋生物物种基础信息数据库”于 2007 年将副溶血性弧菌作为外来入侵物种收录<sup>[13]</sup>。相继, 由中国农业科学院植物保护研究所创建的“中国外来物种入侵数据库”也将副溶血性弧菌定义为外来入侵物种收录在内<sup>[14]</sup>。从副溶血性弧菌的发现历程看, 目前流行于我国的该病原菌可能源自日本, 基于该菌具有较强的变异性、复杂的血清型及传播途径, 很难在种的水平上追踪它们究竟如何在不同地域之间进行传播及我国的副溶血性弧菌究竟源自何处。

目前, 中国大陆副溶血性弧菌食物中毒多与大流行克隆株 O3:K6 血清型菌株有关, 无论是环境中还是食物链中均有大流行克隆的传播, 且中国大陆副溶血性弧菌流行克隆属于亚洲地区 O3:K6 流行克隆小生境<sup>[15]</sup>。就 O3:K6 大流行克隆株而言, 目前发现了众多的衍生型菌株, 且 O3:K6 血清型菌株与其衍生型菌株间分子分型图谱高度相似, 甚至不同地区 O3:K6 血清型菌株也呈现出相似的基因型图谱和生物化学表现型。因此, 可以从血清学和分子生物学两方面对其进行溯源分析。

## 2 O3:K6 的变异分子流行病学特征

### 2.1 血清型及其多样性

副溶血性弧菌根据菌体抗原(O)和荚膜抗原(K)特性可分为多种血清型。副溶血性弧菌的血清型是利用 O 抗原和 K 抗原的组合, 包括 11 种不同的 O 抗原和 71 种不同的 K 抗原来进行血清分型<sup>[16]</sup>。我国最初的副溶血性弧菌 O、K 抗原分型诊断血清, 是由中国药品生物制品鉴定所中国细菌保藏中心副溶血性弧菌专业实验室利用 1982 年从日本引进的参考菌株研制而成的。随后使用该套血清对 1983–1990 年上海地区 1 530 株副溶血性弧菌进行血清分型, 其中能分型的有 1 429 株, 分型率达 93.4%。这也间接的说明中国的副溶血性弧菌与源自日本的副溶血性弧菌有较为相似的生物学特性<sup>[17]</sup>。

近年来由于新 O3:K6 血清型的出现, 导致世界流行的副溶血性弧菌血清型出现大的变化。文献表明, 首株 O3:K6 型分离株是 1995 年从一个由印尼返回日本的旅客体内分离的, 但是当时并没有引起足够的重视。直至 1996 年 2 月, 该血清型菌株在印度的加尔各答出现, 并导致大规模的食物中毒暴发, 且该血清型菌株所致的食物中毒占随后几个月食物中毒事件的 50%–80%。研究者开始将该独特的血清型菌株作为重点研究对象<sup>[18]</sup>。通过一系列研究发现, 加尔各答地区新 O3:K6 血清型与 1982–1993 年人源株 O3:K6 型不同, 却与 1995–1996 年分离自东南亚国家的 O3:K6 型相同, 初步推断可能是新 O3:K6 血清型已在全球范围内

流行所致<sup>[19]</sup>, 且这一推断很快得到证实。在后来的研究中陆续发现了其他与大流行株 O3:K6 具有相同 *toxRs* (副溶血性弧菌种特异性基因, 编码跨膜蛋白, 参与毒力基因的调控)序列及分子分型图谱的血清型<sup>[20]</sup>。这些与大流行株 O3:K6 有相同基因型和分子特征的血清型是由同一株 O3:K6 血清型菌株通过 O、K 抗原的变异而来<sup>[21]</sup>, 因此统称为 O3:K6 克隆。目前在中国台湾及大陆食源性分离株中均发现了大流行克隆菌株 O3:K6 及其衍生血清型菌株, 表明在中国食物链中存在大流行株<sup>[22]</sup>。

中国台湾暴发性食物中毒事件的统计结果显示, O3:K6 血清型可能早在 1995 年 10 月就已出现<sup>[23]</sup>。随后 1997–1998 年期间, 从中国台湾、老挝、日本、泰国、韩国和美国分离得到的 O3:K6 株拥有十分相似的 AP-PCR 图谱<sup>[24]</sup>。事实上早在 1983–1988 年间日本就曾获得 4 株 *tdh* (副溶血性弧菌耐热直接溶血毒素基因)阴性 O3:K6 血清型菌株, 这 4 株组成了独特的 O3:K6 群(相似性>75%), 运用 AP-PCR 技术检测显示这几株 *toxRs* 的序列与 O3:K6 克隆 *toxRs* 的序列相同, 由此 Okura 等推测 O3:K6 致病株可能起源于那些获得了 *tdh* 基因的非致病性 O3:K6 菌株, 即 O3:K6 分离株很可能起源于日本的环境株<sup>[25]</sup>。本文将 O3:K6 克隆株的发现时间及分离地做出了汇总(表 1)。

就副溶血性弧菌本身来说, 分离自不同环境样品中的菌株具有高度的遗传多样性, 如: 海水、沉积物、鱼类的胃肠道、浮游植物、甲壳类等。这些环境中的营养成分、温度、pH 值等理化性质均有所差异, 且这些环境中往往存在有噬菌体, 由噬菌体介导的基因水平转移可能在弧菌属之间频繁发生。正因为如此, 副溶血性弧菌在进化过程中为了提高对环境的适应能力而发生了基因重组和基因水平转移, 这同时也促进了其血清型多样性的形成<sup>[26]</sup>。李婧等通过对 206 株不同来源的副溶血性弧菌分离株进行血清分型, 共分出 42 个血清型, 主要优势弧菌血清型为 O3:K6, 其次为 O4:K8、

O4:K68、O1:K25 和 O3:K29, 还有国内外尚未报道过的 O3:K25、O1:K56 等 14 种新的血清型。在这 206 株菌株中包含 155 株临床株和 51 株环境株, 临床株和环境株各分出 25 种血清型, 部分血清型为环境株和临床株共有, 环境中血清型较为多样化<sup>[27]</sup>。

## 2.2 分子分型

随着分型技术的不断成熟, 副溶血性弧菌的分型已不仅仅局限于血清分型, 在分子水平上也形成了一系列分子生物学分型技术。如核糖体基因分型(Ribotyping)、脉冲场凝胶电泳分型技术(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)、随机扩增多态性片段技术(Random amplified polymorphism DNA, RAPD)、任意引物聚合酶链反应(Arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR)等。这些技术在分子水平上对副溶血性弧菌进行分类鉴定、分型溯源、遗传进化分析及流行病学调查工作中寻找传染源和传播途径等方面发挥了重要作用<sup>[27]</sup>。

用 PFGE 技术在对印度、日本、韩国、中国台湾等地收集的分散的 205 株临床 O3:K6 血清型 VP 进行分型和聚类分析, 结果显示, 1996 年以后在中国台湾发现的与来自于印度、日本、韩国的菌株形成 1 个聚类<sup>[19]</sup>。MLST 适用于不同地域的副溶血性弧菌菌株种群结构的分析, 确定该物种的克隆扩增中重组/突变的影响。采用该技术对 201 株不同来源的副溶血性弧菌菌株进行分析发现, 201 株副溶血性弧菌共分出 63 个 STs, 其中 O3:K6、O3:KUT、O4:K68、O3:K25、O1:K6 和 O1:KUT 等 6 个血清型共 111 株菌同属于 ST3 序列型, 其余的菌株则为 ST331、332、333、433、434、435、444、447、448、452、472 和 478 型, 以及与 ST3 遗传距离较远的其它 STs 型<sup>[28]</sup>。结合 O3:K6 克隆系统性毒力基因及 7 个毒力岛 *Vpals*, 对中国大陆 120 株副溶血性弧菌 MLST 的型别特征和起源进行了研究, 并分析它们与引起世界范围流行的 O3:K6 克隆大流行株始祖菌(Anccestor strain)之间的关系,

结果表明：中国大陆大流行株 O3:K6 克隆与国际  
上大流行株克隆为同一起来源，同属于以 ST3 为原  
始序列型的克隆复合体。而大流行株 O3:K6 克隆

原始序列型 ST3 的始祖菌起源于血清型为 O3:K6  
的非致病性环境株<sup>[15]</sup>，这也进一步支持了 O3:K6  
分离株起源于日本环境株的可能性。

表 1 O3:K6 及衍生血清型在不同国家和地区出现的年代表	
Table 1 Chronology of appearance of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6 and its serovariants in different countries and regions	
血清型 Serotype	发现的国家和地区及分离株的年份 Countries, regions and year of isolation
O1:K25	India (1998); Thailand (1999); Vietnam (1998–1999); Bangladesh (1999–2000)
O1:K33	India (2002)
O1:K36	China (2009)
O1: K41	Thailand (1998–1999); Vietnam (1998–1999)
O1:K56	Vietnam (1998–1999)
O1:KUT	India (1998); Bangladesh (1998, 2000)
O2:K3	India (2002)
O3:K5	India (2004)
O3:K6	India (1996); Peru (1996); Vietnam (1997); Laos (1997); Indonesia (1997); United States (1997–1998); Korea (1997–1998); Chile (1998, 2004); Taiwan, China (1996–1999); Bangladesh (1998–2000); Japan (1998); Thailand (1999); Ecuador (1999); Angola (1999); Russia (2001); Brazil (2001); France (2004); Mozambique (2004); England (2001, 2012); Mexico (2004); Spain (2004)
O3:K25	China (2010)
O3:K68	China (2010)
O3:K75	Vietnam (1998–1999)
O3:KUT	India (2003–2004)
O4:K4	India (2004)
O4:K8	Vietnam (1998–1999)
O4:K10	India (2004)
O4:K12	Thailand (1998–1999); Vietnam (1998–1999); Chile (2004)
O4:K48	China (2010)
O4:K68	India (1998); Thailand (1999); Bangladesh (1998, 2000); Vietnam (1998); Mozambique (2004)
O4:KUT	Vietnam (1998–1999); Spain (1999)
O5:K17	India (2002)
O5:K25	India (2002)
O5:KUT	Vietnam (1998–1999); India (2004)
O6:K18	Taiwan, China (2005)
OUT:KUT	India (2003–2004)

## 2.3 分子进化

2003 年副溶血性弧菌大流行株 RIMD2210633 (1996 年从日本获得的一株 O3:K6 *tdh*<sup>+</sup> 菌株) 全基因组测序的完成为研究副溶血性弧菌, 特别是大流行克隆提供了重要参照基因序列<sup>[29]</sup>。O3:K6 大流行克隆的出现主要是由于副溶血性弧菌在适应环境变化的过程中通过大片段基因水平转移及基因重组, 获得了 *toxRS/new*、丝状噬菌体(*orf8*) 基因等一系列系统性毒力基因及毒力基因岛的结果。大流行克隆的系统性功能基因包括 *orf8*、HU-a、MTase、VP2905、*toxRs/new* 和 *tdh* 基因, 且这些基因为副溶血性弧菌 O3:K6 大流行克隆独有的标志性基因<sup>[30]</sup>。

在弧菌中, *toxRS* 转座子上的 *toxR* 和 *toxS* 转座子编码跨膜蛋白, *toxRS* 转座子参与毒力相关基因的调节, 且在弧菌属中是高度保守的。1996 年前后该转座子分子结构发生变化, 由 *toxRS/old* 突变成成为 *toxRS/new*, 两者的主要区别是基因序列不同, 这一改变成为区别新旧 O3:K6 血清型菌株的依据之一。*toxRS/old* 是 1995 年前的 O3:K6 血清型所拥有的, 而 *toxRS/new* 则是 1996 年后的大流行克隆所特有的<sup>[24]</sup>。大流行株的 Hu-a 序列是在 Hu-a 的 ORF 基因 3' 端插入了一段约 16 kb 的 DNA 序列, 这一插入序列改变了大流行株的 ORF, 从而使其编码的蛋白不同于无插入序列的非大流行株 ORF 的编码蛋白<sup>[31]</sup>。开放阅读框 ORF VP2905 是存在于毒力岛 VPal-5 上的一段长度为 433 bp 的基因序列, 通常只有大流行株才拥有此阅读框。其功能是编码一种功能尚不明确的假设蛋白。MTase 基因编码一含有 233 个氨基酸血细胞凝聚素联合蛋白, 该基因是毒力岛 VPal-1 上的一个阅读框 VP0394<sup>[20]</sup>。

O3:K6 大流行克隆株系统性功能基因的提出为大流行株在分子水平上进行溯源研究提供了依据。通过对 180 株大流行株系统性功能基因的分布发现, 93% 大流行株拥有 *orf8* 基因; 96% 大流行株拥有 HU-a 基因, 非大流行株不含有该基因; 所有大流行株都含有 MTase 基因, 99% 的大流行株含有

VP2905 基因, 非大流行株不含该基因; 89% 的大流行株同时拥有 *orf8*、HU-a、MTase 和 VP2905<sup>[32]</sup>。对副溶血性弧菌而言, 在 6 个系统性功能基因中, 只要含有其中 4 个或者 4 个以上即可断定其为大流行克隆株。通过比较不同地理区域克隆株的系统性功能基因的同源性, 可进一步确定其亲缘关系远近。

## 2.4 致病机制

随着分子生物学的快速发展以及副溶血性弧菌全基因组测序工作的完成, 人们对副溶血性弧菌的致病因子及致病机制有了进一步的了解。副溶血性弧菌的致病性是多种毒力因子共同作用的结果。除了已知的溶血毒素(TDH、TRH、TLH)外, 尿素酶、蛋白酶、侵袭力、黏附因子、外膜蛋白(Outer membrane protein, OMP)、摄铁系统、脂多糖和 III 型分泌系统(Type III secretion systems, T3SSs) 也是其重要的致病因子<sup>[33-36]</sup>。目前研究较多的为三大溶血毒素, 其中耐热直接溶血毒素(TDH)是致病性副溶血性弧菌产生的不含糖和脂质的蛋白质, 有较强的耐热性, 100 °C 加热 10 min 不失活, 有溶血活性、细胞毒性、心脏毒性以及致死性等生物学活性<sup>[37-38]</sup>。据调查, 90% 以上的副溶血性弧菌临床分离株呈 TDH 阳性。TDH 的致病机制大致可以描述为: TDH 溶血毒素首先与结肠上皮细胞膜受体结合, 然后激活蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂使得细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加, 从而激活  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的  $\text{Cl}^-$  通道开放, 导致  $\text{Cl}^-$  从浆膜分泌到黏膜一侧引起腹泻<sup>[38]</sup>。相对耐热的直接溶血素(TRH)是副溶血性弧菌的又一重要的致病毒素, 与 TDH 的氨基酸序列同源性高达 67%<sup>[39]</sup>。TRH 在致病机理上与 TDH 类似, 也可引起细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的增加, 从而导致  $\text{Cl}^-$  分泌增加<sup>[40]</sup>。而不耐热溶血毒素(TLH)是一种非典型的磷脂酶, 无论是临床株还是环境株均含有该毒素基因, 能溶解人和马的红细胞, 但其本身并没有直接溶血活性, 只有当卵磷脂存在的情况下才具有溶血活性, 目前对其致病机理的研究尚不明确<sup>[41]</sup>。

III型分泌系统由 T3SS1 及 T3SS2 两个基因簇构成,分别与细菌对机体的细胞毒性和肠毒性有关。研究发现,T3SSs 可以通过细菌的细胞膜,也可以直接向宿主体内释放细菌的毒力因子<sup>[42-43]</sup>。通过对 T3SS1 和 T3SS2 的分布调查发现,无论是临床株和环境株都拥有 T3SS1,而 T3SS2 目前主要存在于 1996 年后血清型为 O3:K6 的大流行克隆中,1996 年前 O3:K6 血清型菌株则不编码 T3SS2。这说明 T3SS2 与副溶血性弧菌的毒力作用密切相关,其存在可以提高副溶血性弧菌的致病性<sup>[36]</sup>。O3:K6 大流行克隆之所以具有较强的致病性,与这些致病因子的作用密不可分。因此,从致病因子的角度出发,对 O3:K6 大流行克隆引起的食物中毒进行溯源,可以较为准确地进行中毒原因的分析,以便及时进行防控。另一方面,基于这些致病因子发掘新的检测靶点,对于大流行克隆的检测溯源具有直接的现实意义。

### 3 O3:K6 大流行克隆在中国的分布

早期的观点认为副溶血性弧菌食物中毒多因食用海产品所致,因此沿海地区成为副溶血性弧菌食物中毒的高发区。但最近的研究表明:随着物流频率的增加,交叉污染引发的几率也随之加大,导致内地和沿海地区一样,频繁有副溶血性弧菌食物中毒的报道,且多为 O3:K6 大流行克隆所致。2009–2012 年期间,从上海市食物中毒患者体内分离到 622 株副溶血性弧菌临床菌株,血清型分布调查发现,这些临床菌株可分为 27 个血清型,其中以 O3:K6 型为主,约占 61.7%<sup>[44]</sup>。2007–2012 年间从深圳市腹泻病例标本中分离出 168 株副溶血性弧菌,其血清学分析结果表明:168 株菌可分为 14 种血清型,主要血清型为 O3:K6 (114, 67.9%)、O4:K8 (25, 14.9%)、O3:K29 (6, 3.6%);食物中毒分离株与腹泻门诊分离株血清型构成不同,但优势血清型均为 O3:K6<sup>[45]</sup>。采用肠道细菌基因间重复序列(Enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)基因分型技术对宁波市 187 例分离自患者、

海产品和环境中的副溶血性弧菌分型发现 O3:K6 比例高达 86% (161/187)<sup>[46]</sup>。2010 年对江苏及周边地区引发食物中毒的 63 株副溶血性弧菌进行血清分型显示:病人株血清型以 O3:K6 为主(26/57),食品株以 O1:KUT 为主(4/6)<sup>[47]</sup>。2010 年 4–12 月间,从北京监测哨点的肠道门诊腹泻病例标本中分离得到的 112 株副溶血性弧菌,血清分布结果显示:O3:K6 血清型菌株有 72 株,占总分离株的 63.2%<sup>[48]</sup>。截止到目前,我国大陆包括 31 个省份、自治区直辖市,除新疆、青海、云南、西藏、山西和陕西 6 个省份自治区未见有副溶血性弧菌食物中毒报告外,其他地区均有报道。

### 4 检测方法

诸多的研究表明:O3:K6 大流行克隆已在我国广泛分布,且对人类的健康造成严重威胁。因此,建立快速、灵敏的检测方法是预防和控制该菌食物中毒暴发最有效的手段,并对食品安全监控具有重要意义。目前已建立的检测方法有传统的增菌培养法、最大可能数法;免疫学方法:酶联免疫吸附法、免疫荧光抗体法、免疫胶体金技术;分子生物学方法:单一 PCR、多重 PCR、荧光定量 PCR、环介导等温 PCR、纳米 PCR 及反转录 PCR 技术;核酸探针技术、基因芯片技术、变性高效液相色谱技术、DNA 指纹图谱技术以及传感器技术等<sup>[49]</sup>。传统方法工作量大,检测周期长且灵敏度有限,不适合用于快速检测。免疫学方法特异性强,准确度高,但是操作过程复杂。新兴的检测技术如基因芯片、变性高效液相色谱技术等,虽然有较高的灵敏度和准确度,但其对操作人员的专业要求较高,且需要高端的仪器设备,实用性受到一定的限制。目前,以 PCR 为主的分子生物学检测方法以其灵敏、特异、快速的特点,已广泛应用于副溶血弧菌的检测。但常规 PCR 方法仍存在耗时、依赖实验仪器等缺陷,因而无法用于现场便捷式检测以及资源匮乏的地区。

交叉引物恒温扩增技术(Cross-priming amplification, CPA)是新建立的一种 PCR 技术<sup>[50]</sup>,



在恒温条件下,通过 5–8 条引物的作用,能够扩增目的 DNA 或 RNA。整个反应过程操作简单、扩增效率高,同时具有较高的灵敏度和特异性。该技术作为一种病原体快速检测工具,特别适合用于现场检测。该方法最关键的环节在于特异性检测靶点的选择及其引物的设计,其优劣将影响到副溶血弧菌检测效率和特异性。本文作者采用交叉引物恒温扩增技术与核酸试纸条相结合建立了 CPA-核酸试纸条快速检测副溶血性弧菌的方法,利用交叉引物对模板进行恒温扩增,将扩增产物在试纸条上进行检测,整个检测过程只需 60 min。实验过程中,通过对反应体系中的  $Mg^{2+}$ 、甜菜碱、dNTPs、bst DNA 聚合酶等因子的浓度进行优化,确定最佳反应体系,基于最佳反应体系对副溶血性弧菌进行特异性和灵敏度的验证。选取霍乱弧菌、溶藻弧菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等致病菌作为参考菌株进行特异性的验证,结果表明,该方法只对副溶血性弧菌的检测为阳性,其他致病菌均呈阴性(图 1)。通过对过夜培养的菌液进行 10 倍梯度稀释,进行灵敏度的检测,其灵敏性可达  $5.6\times 10^2$  CFU/mL (图 2,该技术已向中华人民共和国知识产权局申请专利)。

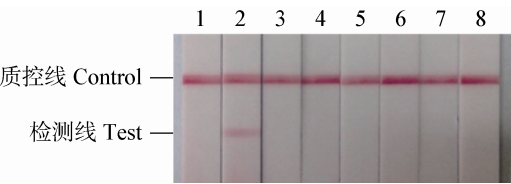


图 1 交叉引物恒温扩增结合核酸试纸条检测副溶血性弧菌的特异性

Figure 1 Specificity of CPA-nucleic acid strip assays for detection of *Vibrio parahaemolyticus*

注: 1: 阴性对照; 2: 副溶血性弧菌; 3: 霍乱弧菌; 4: 溶藻弧菌; 5: 创伤弧菌; 6: 金黄色葡萄球菌; 7: 大肠杆菌; 8: 沙门氏菌。

Note: 1: Negative control; 2: *Vibrio parahaemolyticus*; 3: *Vibrio cholerae*; 4: *Vibrio alginolyticus*; 5: *Vibrio vulnificus*; 6: *Staphylococcus aureus*; 7: *Escherichia coli*; 8: *Salmonella*.

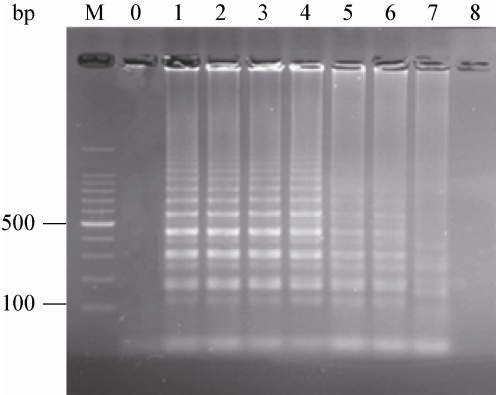


图 2 CPA-核酸试纸条检测副溶血性弧菌纯培养物的灵敏度

Figure 2 Sensitivity of CPA-nucleic acid strip assays for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in pure cultures

注 M :100 bp DNA 分子量标准 ;0 阴性对照 ;1  $5.6\times 10^8$  CFU/mL ; 2 : $5.6\times 10^7$  CFU/mL ; 3 : $5.6\times 10^6$  CFU/mL ; 4 : $5.6\times 10^5$  CFU/mL ; 5 : $5.6\times 10^4$  CFU/mL ; 6 : $5.6\times 10^3$  CFU/mL ; 7 : $5.6\times 10^2$  CFU/mL ; 8 :  $5.6\times 10^1$  CFU/mL.

Note: M: 100 bp ladder marker; 0: Negative control; 1:  $5.6\times 10^8$  CFU/mL; 2:  $5.6\times 10^7$  CFU/mL; 3:  $5.6\times 10^6$  CFU/mL; 4:  $5.6\times 10^5$  CFU/mL; 5:  $5.6\times 10^4$  CFU/mL; 6:  $5.6\times 10^3$  CFU/mL; 7:  $5.6\times 10^2$  CFU/mL; 8:  $5.6\times 10^1$  CFU/mL.

### 5 结论与展望

O3:K6 致病株可能起源于那些获得了 *tdh* 基因的非致病性日本的环境株 O3:K6,该环境株通过大片的基因片段水平转移进行基因重组,获得了一系列系统性毒力基因及毒力基因岛,形成了 1996 年前后引起大规模流行的 O3:K6 大流行克隆。其后为适应环境变化通过基因水平转移而产生 O:K 抗原的转换,形成了包含一系列新血清型的 O3:K6 流行克隆。中国大陆大流行株 O3:K6 克隆与国际上大流行株克隆为同一来源,同属于以 ST3 为原始序列型的克隆复合体,即日本环境株。

目前已建立的副溶血性弧菌的检测技术大多是基于副溶血性弧菌的 3 个毒力基因(*tdh*、*trh*、*tlh*)以及 *ToxR*、*gyrB*、*flae* (鞭毛蛋白基因)等之上。这些检测靶点数量有限,其特异性和灵敏度仍无法满足当今快速、灵敏的检测要求,因此,需要进一步发掘新的分子检测靶点。纵观国内的报道,仅有为



数不多的地区开展了副溶血性弧菌血清型的研究,迄今为止鲜有关于大流行株系统性功能基因的研究,因此在基于系统性功能基因靶点之上,建立快速检测方法对于检测大流行株具有较强的针对性。随着生物信息学和分子生物学技术的发展,大量的细菌基因组被测序并发布,这为从副溶血弧菌基因组中通过序列比对的方法发掘新的分子检测靶点提供了重要的资源。不仅如此,在对大流行株进行溯源研究上,系统性功能基因可能是有力的分子依据。尽管目前对副溶血性弧菌的研究日益深入,但是其致病机理尚未明确,对于大流行株而言,其极强的致病性是否与系统性功能基因有关,有待进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, et al. First clinical report of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 infection in Italy[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(6): 2144-2145.
- [2] Martinez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe[J]. Emerging Infectious Diseases, 2005, 11(8): 1319-1320.
- [3] 藤野恒三郎. シテス中毒事件の細菌学検査報告[J]. 日本传染病学会杂志, 1951(25): 21.
- [4] 竹田美文, 三轮谷俊夫. “肠炎弧菌”(付溶血性弧菌)[J]. 日本细菌学杂志, 1981, 36(4): 617-622.
- [5] Gil AI, Miranda H, Lanata CF, et al. O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Peru[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2007, 11(4): 324-328.
- [6] 王笃圣. 付溶血性弧菌(致病性嗜盐菌)食物中毒[J]. 天津医药, 1978(6): 262-265.
- [7] 叶自儒. 嗜盐菌引起的食物中毒[J]. 中华医学杂志, 1962(68): 534.
- [8] 陈强, 张文尧, 翁末年. 嗜盐菌食物中毒[J]. 中国医刊, 1965(5): 286-287.
- [9] 陈家驹, 黄敏銑. 嗜盐菌食物中毒63例报告[J]. 天津医药杂志, 1965, 7(6): 521-522.
- [10] 宋清林. 嗜盐菌食物中毒[J]. 人民军医, 1963(10): 25-26.
- [11] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅. 用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌发病率[J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(3): 265-267.
- [12] 王化, 李日新. 一类(属)不明肠道菌株的研究[J]. 微生物学报, 1962, 10(1): 128-129.
- [13] 中国外来海洋生物物种基础信息数据库: <http://bioinvasion.fio.org.cn/>. 2013-12-07.
- [14] 中国外来入侵物种数据库: <http://www.chinaias.cn/wjPart/index.aspx>. 2013-12-07.
- [15] Chao G, Wang F, Zhou X, et al. Origin of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clone[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(2/3): 459-463.
- [16] Iguchi T, Kondo S, Hisatsune K. *Vibrio parahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS-PAGE and compositional sugar analysis[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 130(2/3): 287-292.
- [17] 杨正时, 房海. 人及动物病原细菌学[M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003: 653.
- [18] 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(12): 3150-3155.
- [19] Wong HC, Chen CH, Chung YJ, et al. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from Asia[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(9): 3981-3986.
- [20] Chowdhury NR, Chakraborty S, Ramamurthy T, et al. Molecular evidence of clonal *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains[J]. Emerging Infectious Diseases, 2000, 6(6): 631-636.
- [21] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(1): 39-48.
- [22] 叶晓涛, 李迎惠, 陈日炳, 等. 2010-2011年深圳市龙岗区腹泻病原菌的流行特征[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(4): 504-506.
- [23] Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI, et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(12): 4621-4625.
- [24] 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.
- [25] Okura M, Osawa R, Iguchi A, et al. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(10): 4676-4682.
- [26] Gonzalez-Esealona N, Martinez-Urtaza J, Romero J, et al. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(8): 2831-2840.
- [27] 李婧, 邱少富, 刘雪林, 等. 副溶血弧菌分子分型技术研究进展及应用[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(11): 1533-1537.
- [28] 李婧, 邱少富, 宋宏彬, 等. 沈阳地区副溶血弧菌毒力基因检测及脉冲场凝胶电泳分析[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(12): 1833-1837.

- 2012, 28(5): 696-698.
- [29] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. Lancet, 2003, 361(9359): 743-749.
- [30] 徐岚, 周丽萍, 王艳, 等. 副溶血性弧菌系统性功能基因分布研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(4): 688-694.
- [31] Williams TL, Musser SM, Nordstrom JL, et al. Identification of a protein biomarker unique to the pandemic O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(4): 1657-1665.
- [32] Chao GX, Jiao XA, Zhou XH, et al. Systematic functional pandemic strain-specific genes, three genomic islands, two T3SSs in foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in China[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2009, 6(6): 689-698.
- [33] Cai Y, Ni Y. Purification, characterization, and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1996, 10(2): 70-73.
- [34] Lee CY, Cheng MF, Yu MS, et al. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio Parahaemolyticus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 31-37.
- [35] Chakrabarti MK, Sinha AK, Biswas T. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* to rabbit intestinal epithelial cells *in vitro*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1991, 68(1): 113-117.
- [36] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. Lancet, 2003, 361(9359): 743-749.
- [37] Honda T, Ni Y, Miwatani T, et al. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is a pore-forming toxin[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(11): 1175-1180.
- [38] Takahashi A, Sato Y, Shiomi Y, et al. Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line[J]. Journal of Medical Microbiology, 2000, 49(9): 801-810.
- [39] Iida T, Park KS, Suthienkul O, et al. Close proximity of the *tdh*, *trh* and *ure* genes on the chromosome of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Microbiology, 1998, 144(pt9): 2517-2523.
- [40] 李志锋, 戴迎春. 副溶血弧菌的溶血毒素研究现状[J]. 解放军预防医学杂志, 2003, 21(1): 73-75.
- [41] Yanagase Y, Inoue K, Ozaki M, et al. Hemolysins and related enzymes of *Vibrio parahaemolyticus*. I. Identification and partial purification of enzymes[J]. Biken Journal, 1970, 13(2): 77-92.
- [42] Comelis GR, Gijsegem FV. Assembly and function of type III secretory systems[J]. Annual Review of Microbiology, 2000(54): 735-774.
- [43] Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial Pathogens of animals and plants[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(2): 379-433.
- [44] 张红芝, 顾其芳, 刘诚, 等. 2009-2012年上海市副溶血性弧菌血清分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4): 363-366.
- [45] 张勇, 赖植发, 周海涛, 等. 副溶血性弧菌临床分离株血清型, 毒力基因和 PFGE 分子分型特征分析[J]. 卫生研究, 2013, 42(4): 619-624.
- [46] 宋启发, 徐景野, 朱国良, 等. 肠道细菌基因间重复序列基因分型方法研究副溶血性弧菌的基因多态性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(1): 12-15.
- [47] 刘丽萍, 陈盛霞, 徐岚, 等. 江苏及周边地区副溶血性弧菌分子流行病学特征研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(2): 10-13.
- [48] 黄芳, 邓英, 曲梅, 等. 2010年北京市感染性腹泻病原学监测分析[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(9): 820-824.
- [49] 刘阳, 孔繁德, 徐淑菲, 等. 副溶血弧菌检测技术的研究进展[J]. 经济动物学报, 2013, 16(1): 49-54, 62.
- [50] Fang RD, Li X, Hu L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(3): 845-847.