

· 论 著 ·

青浦区水产品中副溶血性弧菌污染状况与分子分型特征^{*}

徐秋芳¹, 卢晓芸¹, 陈洪友², 施怡茹^{1△}

(1. 上海市青浦区疾病预防控制中心 201700; 2. 上海市疾病预防控制中心 200336)

摘要:目的 了解副溶血性弧菌在青浦区部分市售水产品中的污染情况及分子分型。方法 于不同季度, 分别从酒店、农贸市场和大型超市采取鱼类、虾和贝类等标本, 参照 GB 4789. 7, 采用稀释培养计数(MPN)法进行副溶血性弧菌定量检测, 并完成分离菌株毒力基因和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型的检测。结果 144 份水产品中共检出副溶血性弧菌 68 份, 阳性率为 47. 00%, 虾类、贝类和鱼类中副溶血性弧菌几何平均数分别为 465. 2、291. 0、146. 1 MPN/g; 所检出菌株均不携带 TDH 和 TRH 2 种毒力基因, 68 株副溶血性弧菌 PFGE 共分为 63 种带型, 呈现明显多态性。结论 青浦区市售水产品中副溶血性弧菌污染较严重, 应采取有效措施防止由水产品引起的副溶血性弧菌食源性疾病, 该地区菌株间遗传同源关系较远。

关键词:水产品; 副溶血性弧菌; 毒力基因; 脉冲场凝胶电泳

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 19. 014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)19-2733-03

Study on the pollution status and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus*^{*}

XU Qiufang¹, LU Xiaoyun¹, CHEN Hongyou², SHI Yiru^{1△}

(1. The Center for Disease Control and Prevention of Qingpu, Shanghai 201700, China;

2. The Center for Disease Control and Prevention of Shanghai, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective To explore the pollution status and molecular characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in retail aquatic products in Qingpu District. **Methods** Samples of fish, shrimp and shellfish from the hotel, farmers market and super market in different seasons were collected, and then *Vibrio parahaemolyticus* was isolated and identified by MPN method according to the GB 4789. 7, the detection of the virulent genes and molecular typing of the isolated strains were completed. **Results** A total of 68 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were detected among 144 samples of aquatic products, the positive rate was 47. 00%. The geometric mean concentration of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp, shellfish and fish were 465. 2, 291. 0, 146. 1 MPN/g. All the detected strains didn't carry the TDH and TRH virulent genes, 68 strains were divided to 63 patterns by pulse alternative field gel electrophoresis(PFGE) method, which showed high polymorphic. **Conclusion** The *Vibrio parahaemolyticus* pollution is serious in retail aquatic products in Qingpu District, the monitoring on preventing the food poisoning and food origin disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* should be strengthened, there is no homology relationship among the detected strains.

Key words: aquatic product; *Vibrio parahaemolyticus*; virulence gene; pulse alternative field gel electrophoresis

副溶血性弧菌是一种革兰阴性嗜盐菌, 主要分布于海河交界处、近海海水、海产品及淡水产品中。近年来, 由副溶血性弧菌感染引发的食物中毒已经成为世界范围内严重的食源性公共卫生问题之一, 如日本、美国、泰国等地发生的细菌性食物中毒事件中有 50% 以上由副溶血性弧菌引起^[1], 该菌也是上海地区集体性食物中毒的首要致病原^[2]。本研究拟对青浦辖区内覆盖较多人口的农贸市场、大型超市和酒店出售的水产品进行主动监测, 通过副溶血性弧菌定量检测的方法, 了解其污染情况。同时对保存的菌株进行毒力基因的检测和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型, 以了解其致病性和基因型的分布情况。

1 材料与方法

1.1 标本采集 所有检测的标本采自青浦区的各农贸市场、酒店、超市等不同场所; 采样时间为每月一次, 每次 12 件, 采样类别包括鱼、虾和贝类产品, 包括活产品、冰鲜或冷冻产品, 按照海水产品: 淡水产品 = 1: 1 的比例进行采样, 总共采集水

产品 144 份, 其中鱼类 84 份, 虾类 27 份, 贝壳类 33 份。采样过程无菌操作, 以接近采样温度 2 h 内运送至实验室进行检测, 避免弧菌损伤死亡。

1.2 仪器与试剂 检测所用 3% 氯化钠碱性蛋白胨水、科玛嘉弧菌显色培养基、PFGE 所用试剂耗材、ATB 所用生化试剂条 ID 32E、Premix ExTaq Version20 和 DL2000TM DNA Maeker 均由上海申捷股份有限公司配送, 皆在有效期内使用。

1.3 副溶血性弧菌定量检测方法 按照 GB 4789. 7-2013《食品安全国家标准-食品微生物学检验》中副溶血性弧菌检验介绍, 采用稀释培养计数(MPN)法对样品中副溶血性弧菌进行定量检测, 阳性菌株均经过 ATB 生化试验确定。总取样量为 3. 33 g, 检出限为 0. 3 MPN/g。

1.4 毒力基因(TDH 和 TRH)检测 采用热裂解法提取细菌 DNA, 应用 PCR 方法检测耐热溶血素基因 TDH 和耐热溶血素相关毒力基因 TRH, 检测引物为双重引物^[3], 见表 1, 由上海生工生物工程有限公司合成。阳性对照为副溶血性弧

^{*} 基金项目: 青浦区卫生和计划生育委员会项目(W2015-18)。

作者简介: 徐秋芳, 女, 主管技师, 主要从事病原微生物检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: qpcdsyr@163. com。

菌 06365 株(TDH+ TRH+),由上海市疾病预防控制中心微生物室提供。

表 1 PCR 引物名称、序列及产物大小							
引物		序列				目标片段大小(bp)	
TDH-L	5'-GTA	AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC-3'					270
TDH-R	5'-TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC-3'						
TRH-L	5'-TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT-3'					500	
TRH-R	5'-CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G-3'						

1.5 PFGE 分子分型 参考美国 CDC Pulse Net USA 的方法。副溶血性弧菌菌株选用 Not I 酶切,参考菌株(沙门菌株 H9812)用 Xba I 酶切,作为相对分子质量标准进行 PFGE 分子分型检测。用 BioNumerics 对电泳图谱进行聚类分析。沙门菌株 H9812 由上海市疾病预防控制中心微生物室提供。

1.6 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同类别样品中副溶血性弧菌检出率 2015 年共采集 144 份水产品,副溶血性弧菌阳性(>0.3 MPN/g)为 68 份,检出率为 47.00%;其中鱼类的检出率为 40.48%,虾类的检出率为 48.15%,贝类的检出率为 65.64%,三者之间以贝类的检出率最高,但三者检出率差异无统计学意义($\chi^2=5.11, P=0.078$)。活水产品副溶血性弧菌检出率(65.82%)明显高于冰鲜和冷冻水产品中副溶血性弧菌的检出率(24.62%),差异有统计学意义($\chi^2=24.30, P=0.000$)。酒店来源的水产品中副溶血性弧菌的检出率明显高于农贸市场和超市来源的水产品中副溶血性弧菌的检出率,其检出率分别为 78.00%、46.94%和 13.33%,差异有统计学意义($\chi^2=10.20, P=0.001$),见表 2;海水产品和淡水产品中的副溶血性弧菌检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.11, P=0.738$)。虾类的几何平均污染量高于鱼类和贝类,分别为 465.2、291.0、146.1 MPN/g,且淡水虾类的副溶血性弧菌检出率(70.59%)明显高于海水虾类的副溶血性弧菌检出率(10.00%),经 Fisher 精确检验,其差异有统计学意义($P=0.004$),见表 3。

表 2 青浦区 2015 年不同类别样品副溶血性弧菌检出率					
样品组成	样品数(n)	检出数(n)	检出率(%)	χ^2	P
品种					
鱼类	84	34	40.48	5.11	0.078
虾类	27	13	48.15		
贝类	33	33	63.64		
鲜活与否					
是	79	52	65.82	24.30	0.000
否	65	16	24.62		
产品来源					
海水产品	72	33	45.83	0.11	0.738
淡水产品	72	35	48.61		

续表 2 青浦区 2015 年不同类别样品副溶血性弧菌检出率					
样品组成	样品数(n)	检出数(n)	检出率(%)	χ^2	P
购买来源					
酒店	50	39	78.00	10.20	0.001
农贸市场	49	23	46.94		
超市	45	6	13.33		

表 3 青浦区 2015 年不同来源鱼虾贝类样品副溶血性弧菌检出率								
产品来源	海水产品			淡水产品			χ^2	P
	样品数(n)	检出数(n)	检出率(%)	样品数(n)	检出数(n)	检出率(%)		
鱼类	39	16	41.03	45	18	40.00	0.01	0.924
虾类*	10	1	10.00	17	12	70.59		0.004
贝类*	23	16	69.57	10	4	40.00		0.139

注:* 表示 Fisher 精确检验。

2.2 不同季度标本中副溶血性弧菌污染情况 不同季度副溶血性弧菌的检出率见表 4,第三季度的检出率最高,达到 66.67%,不同季度副溶血性弧菌的检出率比较,差异有统计学意义($P=0.018$)。全年 12 个月均能在水产品中检测出副溶血性弧菌,检出高峰主要集中在 5~11 月,污染量大于 200 MPN/g,主要集中在 5~10 月。见图 1。

表 4 青浦区 2015 年不同季度样品副溶血弧菌检出率					
季度	样品数(n)	检出数(n)	检出率(%)	χ^2	P
第一季度	36	11	30.56	10.03	0.018
第二季度	36	18	50.00		
第三季度	36	24	66.67		
第四季度	36	15	41.67		

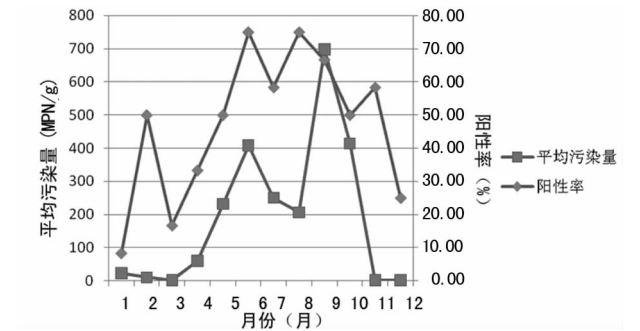


图 1 不同月份水产品中副溶血性弧菌的污染情况

2.3 副溶血性弧菌分离株毒力基因携带情况 对 68 株副溶血性弧菌毒力基因 TDH 和 TRH 进行检测,结果未发现携带 TDH 或 TRH 的菌株。

2.4 副溶血性弧菌分离株 PFGE 分型情况 68 株副溶血性弧菌基因组 DNA 片段都得到良好分离,各菌株 DNA 分为 15~20 个条带。用 BioNumerics 软件对 68 种 PFGE 图谱进行聚类分析。68 株菌共分为 63 种 PFGE 型,相似值为 50%~100%。

3 讨 论

本研究对青浦区部分农贸市场、酒店和超市中的海水类和淡水类水产品进行了副溶血性弧菌监测,总的检出率为 47.00%,高于上海市市售水产品中副溶血性弧菌的检出率 5.6%^[4];鱼类、虾类和贝类中副溶血性弧菌的检出率和污染量均较高,提示青浦区市售水产品中副溶血性弧菌污染较严重,有明显的季节性,检出高峰主要集中在 5~11 月,污染量大于 200 MPN/g,与上海市细菌性食物中毒发生季节基本一致。因此在 5~10 月,应加强治理水产品污染问题,防止水产品引起的副溶血性弧菌食源性疾病。

有研究报道,浙江省以海虾和海蟹引起的副溶血性弧菌源性疾病最多见,分别占发病总数的 21.5%和 13.7%^[5],提示需要关注的副溶血性弧菌污染源头主要是海水产品,但监测数据显示海水产品和淡水产品中副溶血性弧菌检出率均较高,且差异无统计学意义($P>0.05$),但淡水虾的副溶血性弧菌检出率明显高于海水虾的检出率,加上虾类副溶血性弧菌几何平均数最高,因副溶血性弧菌在无盐的环境中不能生长,因此淡水虾中的副溶血性弧菌污染存在的潜在威胁容易被忽视。冰鲜和冷冻均可能造成副溶血性弧菌的大量损伤或死亡,导致检出率较低^[6],本次监测中活的水产品副溶血性弧菌检出率明显高于冰鲜或冷冻水产品。因此冰鲜和冷冻销售有利于降低副溶血性弧菌食源性疾病的风险。2004~2011 年上海市集体性食物中毒资料调查显示^[7],引起 18 起婚宴食物中毒的致病原均为副溶血性弧菌。而酒店正是承办婚宴的主要场所,监测数据显示酒店水产品中副溶血性弧菌的检出率较高,可能与酒店养殖环境比较封闭,各类水产品间容易出现交叉污染有关。因此治理酒店的水产品污染问题是解决集体性食物中毒的关键。

近年来,青浦区由副溶血性弧菌引起的食物中毒时有发生报道^[8],由副溶血性弧菌污染引起的食品安全问题越来越受到重视。TDH 和 TRH 毒力基因是副溶血性弧菌的主要致病基因,2015 年监测水产品过程中分离的 68 株副溶血性弧菌均不携带 TDH、TRH 毒力基因,与众多报道一致^[9-10],但很难解释副溶血性弧菌食物中毒高发生率的相关性。有报道提示外环境或水产品中致病性副溶血性弧菌水平远远高于非致病性副溶血性弧菌^[10],不能排除在致病菌株和非致病菌株同时存在时,非致病菌株容易掩盖致病菌株的可能。而本研究和类似研究中^[6],1 个样品只分离了 1 株菌株进行毒力基因检测,因此除了寻找比常规方法更为敏感的检测手段外,还应该在同一样品中多分离几株副溶血性弧菌进行毒力基因筛查。

PFGE 对细菌性传染病监测、传染源追踪、传播途径的调查和识别等有着非常重要的意义,是目前分子分型方法的金标准^[11]。根据 Tenover 等^[12]和 Talon 等^[13]解释,相似性大于或等于 85%被认为是来自同一克隆株,只有 8 株菌株 3 个型,可认为是同一克隆株,其菌株均分离自同一采样地点的不同样品中。本次调查收集的 68 株副溶血性弧菌共得到 63 种不同谱型,相似值为 50%~100%,表明青浦区市售水产品副溶血性弧菌间遗传同源关系较远,呈现广泛的分子多态性,无优势 PFGE 基因型,基因型分布与水产品的采集时间、地点及种类无相关性。

综上所述,通过对本区市售水产品一年的连续污染状况监测和主要毒力基因的分布研究,初步获得市售水产品污染状况的背景资料,对于控制其引发食物中毒事件将起到很好的指导

作用,为本区的食品安全风险评估和建立有效的食源性疾病预防关键点提供了科学依据,也为继续开展不同来源的副溶血性弧菌致病性研究奠定了基础。本研究通过 PFGE 分子分型方法对青浦区市售水产品中副溶血性弧菌初步建立指纹图谱库,将有利于进一步追踪传染源,全面防止副溶血性弧菌食源性疾病的发生。

参考文献

- [1] Chiou CS, Hsu SY, Chiu S, 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]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(12): 4621-4625.
- [2] 田明胜, 郑雷军, 彭少杰, 等. 2000~2007 年上海市副溶血性弧菌致集体性食物中毒资料分析及对策[J]. *上海食品药品监管情报研究*, 2009, 20(2): 42-45.
- [3] 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.
- [4] 张磊, 彭少杰, 戚柳斌, 等. 2006~2007 年上海市市售食品污染物监测结果分析[J]. *环境与职业医学*, 2008, 25(4): 337-341.
- [5] 张凡非. 副溶血性弧菌及其引起的食物中毒检验研究进展[J]. *中国卫生监督杂志*, 2003, 10(1): 8-10.
- [6] 曹春远, 林英华, 李美华, 等. 龙岩市水产品中副溶血性弧菌污染状况及分子特征研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(3): 419-421.
- [7] 郑雷军, 吕岩, 王李伟, 等. 上海地区婚宴食物中毒发生情况及预防措施[J]. *上海预防医学*, 2012, 24(5): 262-263.
- [8] 徐秋芳, 童锐, 费琼, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒的病原学检测与分析[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2013, 33(3): 377-379.
- [9] 张蔚, 孟冬梅, 潘劲草, 等. 杭州地区临床和环境分离副溶血弧菌菌株携带毒力基因的特征[J]. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(3): 200-203.
- [10] 张凡非, 杉山宽治, 西尾智裕, 等. 环境样品中病原性副溶血性弧菌高效检出法[J]. *中国卫生检验杂志*, 2002, 12(3): 272-274.
- [11] 李薇薇, 王晓英, 裴晓燕, 等. 采用脉冲场凝胶电泳和自动化核糖体分型技术分析 MPN 法分离出的副溶血性弧菌的同源性[J]. *卫生研究*, 2010, 39(3): 374-380.
- [12] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [13] Talon D, Cailleaux V, Thouverez M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Hosp Infect*, 1996, 32(2): 135-145.