

论著

舟山市贝类副溶血性弧菌污染状况监测及不同来源菌株的毒力基因分析

唐丽华,王虹玲

(浙江省舟山市疾病预防控制中心,浙江 舟山 316021)

摘要:目的 监测2009年舟山市海产贝类副溶血性弧菌的污染状况,分析贝源分离株和临床分离株的毒力基因分布情况,了解舟山市副溶血性弧菌的流行规律。方法 分春夏秋冬四季对80份舟山市售海产贝类中的副溶血性弧菌进行监测,并对50株贝源分离株和18株部分散发腹泻病例和食物中毒临床分离株进行部分血清分型及*tdh*、*trh*、*orf8*和*toxRS/new*4种毒力基因检测。结果 春(85%)、夏(80%)、秋(75%)三季的检出率差异无显著性,冬季检出率(10%)明显低于其它季节($P < 0.01$)。贝源分离株*tdh*、*toxRS/new*和*orf8*基因检测结果均为阴性,只有冬季检出的2株*trh*阳性。临床分离株中有14株*tdh*、*toxRS/new*和*orf8*基因均为阳性,1株*trh*阳性,其余3株4种毒力基因均为阴性,说明这18株中有14株(占77.78%)属于大流行株,其中13株(占92.86%)为O3:K6型,1株为O1:KUT型。结论 春、夏、秋三季海产贝类中副溶血性弧菌的污染率比较高;污染的贝类海产品可能是人感染副溶血性弧菌的主要污染源;一群关系密切,*tdh*、*orf8*、*toxRS/new*均为阳性的O3:K6克隆群在舟山成优势流行。

关键词:副溶血性弧菌;毒力基因;监测

中图分类号:S85;R37 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2011)02-0123-04

Surveillance on the contamination of *Vibrio parahaemolyticus* and analysis on its virulence genes

Tang Lihua, Wang Hongling

(Zhoushan Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Zhoushan 316021, China)

Abstract: Objective To survey the contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish in 2009, and to study the type of virulent genes in isolates from shellfish and clinical samples, in order to find out the epidemic rules of *Vibrio parahaemolyticus* in Zhoushan. **Methods** Eighty shellfish samples were collected from Zhoushan markets in four seasons. Fifty isolates from shellfish and 18 isolates from parts of sporadic diarrhea cases and food poisoning patients were serotyped, and the virulent genes, including *tdh*、*trh*、*orf8* and *toxRS/new* genes, were detected by PCR. **Results** The positive rate of *Vibrio parahaemolyticus* was not significantly different among samples collected in spring (85%), summer (80%) and autumn (75%), while the positive rate in winter (10%) was significantly lower than other seasons. The virulent *tdh*, *toxRS/new* and *orf8* genes were all negative in shellfish isolates, and only virulent *trh* gene was detected in two isolates collected in winter. The virulent *tdh*, *toxRS/new* and *orf8* genes were positive in 14 clinical isolates and *trh* gene was positive in another one clinical isolate. The 4 virulent genes were all negative in the remaining 3 isolates. The results showed that *Vibrio parahaemolyticus* strains in 14 of 18 clinical isolates (77.78%) were pandemic strains, of which 13 strains (92.86%) were categorized as type O3:K6, and one was categorized as type O1:KUT. **Conclusion** The contamination of *Vibrio parahaemolyticus* was serious in shellfish in spring, summer and autumn; the shellfish contaminated by *Vibrio parahaemolyticus* maybe the main source for human diarrhea; A group of *Vibrio parahaemolyticus* strains with positive O3:K6 type *tdh*、*orf8* and *toxRS/new* genes was endemic in Zhoushan.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; virulent gene; surveillance

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种

分布极广的海洋细菌,夏季海水及海产品中常带有此菌。有调查表明,海产品中尤以贝壳类动物中副溶血性弧菌污染程度最为严重^[1]。近年来随着生活水平的提高、饮食模式的多样化,人们把生食或半生食贝类、甲壳类海产品作为一种时尚饮食习惯,因此副溶血性弧菌中毒呈显著上升趋势,已占各类食物中毒事件的首位。舟山市贝类资源丰富,

收稿日期:2010-07-02

基金项目:浙江省医学重点学科建设项目(07-F11);舟山市科技计划项目(07118)

作者简介:唐丽华 女 技师 研究方向为微生物检测

通信作者:王虹玲 女 副主任技师 研究方向为病原微生物检测

又是著名的旅游胜地,几乎每年都有本地居民或外地游客因食用海产贝类而引起食物中毒。副溶血性弧菌是重要的食源性致病菌,副溶血性弧菌食物中毒占各类食物中毒事件的70%以上^[2]。为此,对舟山市贝类海产品中的副溶血性弧菌进行监测,并对这些贝源分离株及部分人源分离株进行血清型分型和 *tdh*、*trh*、*orf8* 和 *toxRS/new* 4种毒力基因检测,以了解舟山市副溶血性弧菌的流行规律及毒力基因携带情况。

1 材料与方法

1.1 试剂

API 20NE 试剂条(法国生物梅里埃公司),科玛嘉弧菌显色培养基(郑州博赛生物技术股份有限公司),三塘铁培养基、碱性蛋白胨培养基和胰酪胨大豆琼脂(杭州天和微生物试剂有限公司)。副溶血性弧菌血清诊断试剂盒(日本生研所)。毒力基因引物[金思特(南京)有限公司]。

1.2 贝类样本和临床菌株来源

2009年在舟山市水产市场随机采集人们经常生食和半生食的贝类海水产品,如毛蚶、蛏子、花蛤、海瓜子、贻贝、牡蛎及各种海螺等鲜活贝类。采样时充分考虑环境温度(养殖水温)的影响,同时兼顾样品的代表性。采样周期为1年,分春(4月)、夏(8月)、秋(11月)、冬(1月)四季共进行4次,每次采集20份。样品采集后立即进行副溶血性弧菌分离,分离后的菌株磁珠于-70℃长期保存。

18株人源株由2009年6—10月间食物中毒病人和散发腹泻病人体内分离得到。

1.3 副溶血性弧菌的分离与鉴定

按GB 4789.7—2003《食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验》^[3]方法进行。

1.4 菌株血清学分类

11种O血清和常见K血清为日本生研所产品,在有效期内使用。取一定量细菌于生理盐水中,将菌悬液转移到离心管内,121℃灭菌1h,灭菌后4000 r/min离心15 min,弃上清,沉淀用生理盐水洗涤3次,每次按4000 r/min离心15 min,最后一次取沉淀菌体与O血清进行凝集,同时以生理盐水作对照。

1.5 毒力基因 *tdh*、*trh*、*orf8* 和 *toxRS/new* 检测

引物序列参照文献[4],见表1。PCR扩增体系:总反应体系为25 μl,包括10×缓冲液2.5 μl、引物20 μmol/L、MgCl₂ 2 mmol/L、dNTPs 2 mmol/L、Taq酶1 U、细菌DNA粗制模板2.0 μl、H₂O补足25 μl。*tdh*和*trh*的反应条件:94℃预变性3 min,94

℃ 55 s、50℃ 50 s、72℃ 2 min,循环30次,72℃延伸10 min;*orf8*和*toxRS/new*的反应条件:94℃预变性3 min,94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 60 s,循环35次,72℃延伸5 min。取扩增产物8 μl在1.5%琼脂糖凝胶上电泳,用Alphalmager™凝胶成像系统照相。

表1 *tdh*、*trh*、*orf8* 和 *toxRS/new* 基因扩增引物序列

基因名称	序列	产物长度 (bp)
<i>tdh</i>	F 5'-ATATCCATGTTGGCTGCATTTC-3'	531
	R 5'-TTATTGTTGATGTTTACATTCAAAA-3'	
<i>trh</i>	F 5'-ATGAAACTAAAACCTACTTTC-3'	553
	R 5'-TTAATTTTGTGACATACATTCAT-3'	
<i>orf8</i>	F 5'-GTTTCGCATACAGTTGAGG-3'	700
	R 5'-AAGTACAGCAGGAGTGAG-3'	
<i>toxRS/new</i>	F 5'-TAATGAGGTAGAAACA-3'	651
	R 5'-ACGTAACGGGCTACA-3'	

2 结果

2.1 不同季节海产贝类中副溶血性弧菌的监测结果

对不同季节的80份鲜活贝类水产品进行副溶血性弧菌检测,结果显示:春、夏、秋三季间检出率差异无统计学意义,冬季检出率最低,与春、夏、秋三季的差异显著($P < 0.01$),见表2。

表2 不同季节海产贝类副溶血性弧菌检出率的比较

采样季节 (月份)	水温 (℃)	样本数	检出数	检出率 (%)
春(4)	14	20	17	85.0
夏(8)	22	20	16	80.0
秋(11)	12	20	15	75.0
冬(1)	4	20	2	10.0
合计		80	50	62.5

2.2 血清分型结果

贝类中分离的50株副溶血性弧菌菌株(除1株不能分型外)分属7个血清群,18株人源株有13株(72.2%)属于O:3群,且均为O3:K6型,4株属于O:1群,1株属于O:4群,见表3。

2.3 毒力基因 *tdh*、*trh*、*orf8* 和 *toxRS/new* 检测结果

50株贝源分离株中只有冬季检出的2株*trh*阳性,其余48株4种毒力基因均为阴性。18株人源分离株中14株*tdh*、*toxRS/new*和*orf8*3种毒力基因为阳性,1株*trh*阳性,其余3株4种毒力基因均为阴性,见表4。

表3 68株副溶血性弧菌分离株血清分型结果
Table 3 Serotyping for *Vibrio parahaemolyticus* in 68 isolates

菌株来源	血清型														合计			
	O:1		O:2		O:3		O:4		O:5		O:10		O:11				不能分型	
	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)	株数	构成比 (%)
贝类分离株	11	22.0	5	10.0	1	2.0	7	14.0	3	6.0	11	22.0	11	22.0	1	2.0	50	100
临床分离株	4	22.2	0	0	13	72.2	1	5.6	0	0	0	0	0	0	0	0	18	100
合计	15	22.1	5	7.4	14	20.6	8	11.8	3	4.4	11	16.2	11	16.2	1	1.5	68	100

表4 68株副溶血性弧菌分离株毒力基因检测结果

Table 4 Virulent gene of *Vibrio parahaemolyticus* in 68 isolates

菌株来源	菌株数	毒力基因			
		<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>orf8</i>	<i>toxRS/new</i>
贝类分离株	48	-	-	-	-
	2	-	+	-	-
临床分离株	14	+	-	+	+
	1	-	+	-	-
	3	-	-	-	-

3 讨论

3.1 舟山市不同季节海产贝类中副溶血性弧菌污染情况

本研究对舟山地区不同季节海产贝类中的副溶血性弧菌污染情况进行调研,研究结果显示,舟山地区海产贝类中副溶血性弧菌污染情况严重。尤其是春夏秋三季,60份样品中检出48株副溶血性弧菌,阳性率为80%。这可能与舟山地处沿海地区,海洋环境中本身含有大量的副溶血性弧菌,而贝类作为一种“非选择性滤食”的海洋生物,对环境污染物包括病原微生物的“富集”能力强有关。而冬季贝类中副溶血性弧菌的检出率比较低,20份样品中检出2株,可能是水环境太冷而难以适合副溶血性弧菌的生长,所以春夏秋三季都是副溶血性弧菌引发腹泻的流行期。建议卫生监督部门在此期间特别加强对海鲜大排档、水产加工销售的酒楼和宾馆的餐前监督,减少副溶血性弧菌引起的食物中毒事件的发生;同时,疾控部门应加强宣传教育,预警高危食品,提高民众的公共卫生意识;另外消费者也应该自觉加强防范,少吃或者禁吃生鲜海产品。

3.2 不同来源副溶血性弧菌血清型分布情况

贝类中分离的50株菌株经副溶血性弧菌11种O血清凝集分群,分属于7个血清群:O:1群、O:2群、O:3群、O:4群、O:5群、O:10群、O:11群,其中O:1群、O:10群、O:11群均有11株,共占66%。提示舟山市贝类海产品中携带的副溶血性弧菌呈多样性分布。而人源副溶血性弧菌的血清型分布则相对比较集中,18株人源株中有13株属于O:3群,且均为O3:K6型,占72.2%,4株属于O:1群,1株

属于O:4群。

3.3 不同来源副溶血性弧菌的毒力因子分布情况

副溶血性弧菌能产生两种主要的毒力因子,耐热直接溶血素(TDH)和TDH相关溶血素(TRH),有些菌株能同时产生两种毒素。1996年后,一种新的仅TDH阳性的O3:K6群副溶血性弧菌菌株引起了包括亚洲、美洲等多个国家在内的大流行,研究发现这种新流行株均带有*orf8*基因,该基因编码一种粘附蛋白,使得细菌对宿主肠道细胞或海洋生物表面的粘附能力增强^[5,6]。另外有研究表明大流行株中均携带有*toxRS/new*基因,该基因编码与菌株毒力相关的穿膜蛋白^[4]。也有研究表明*toxRS/new*基因的存在是大流行株的必要不充分条件,而*orf8*基因的存在是大流行株的充分不必要条件^[7]。本研究中毒力基因检测结果显示,50株贝源分离株*tdh*、*toxRS/new*和*orf8*检测结果均为阴性,只有冬季检出的2株*trh*阳性;18株临床分离株中有14株*tdh*、*toxRS/new*和*orf8*3种毒力基因为阳性,说明这18株中有14株(占77.78%)属于流行株,其中13株(占92.86%)为O3:K6型,1株为O1:KUT型,说明一群关系密切、*tdh*阳性、*toxRS/new*阳性、*orf8*阳性的O3:K6克隆群的流行株在舟山呈优势流行,这也与近年来国内外的相关报道一致^[4,8]。另外18株临床株中,有3株为非致病株,至于非致病株侵入患者体内并致病的机制,目前尚不清楚。虽然环境中很难检出致病株,但这并不意味着不是食源性疾病发生的重要流行病学因素,而是外环境中存在的副溶血性弧菌复杂性的一个反映。可能是因为环境中非致病株占绝对的主导优势,掩盖了致病株,传统方法很难检出致病株,至于如何提高环境中致病性副溶血性弧菌的检出率还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘秀梅,程苏云,陈艳,等. 2003年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(2):97-99.
- [2] 薛超波,龚红霞. 浙江省舟山市海产品中副溶血性弧菌的定量检测[J]. 疾病监测, 2008, 23(7):343-346.

- [3] 中国标准化委员会. GB 4789.7—2003 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [4] CHAO Guoxiang, JIAO Xinan, ZHOU Xiaohui, et al. Serodiversity, pandemic O3:K6 clone, molecular typing, and antibiotic susceptibility of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Jiangsu, China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6(8):1021-1028.
- [5] NASU H, IIDA T, SUGAHARA T, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6):2156-2161.
- [6] MAHMUD Z H, KASSU A, MOHAMMAD A, et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan [J]. *Microbiol Res*, 2006, 161(1):25-37.
- [7] OKURA M, OSAWA R, ARAKAWA E, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7):3533-3536.
- [8] OKURA M, OSAWA R, IGUCHI A, et al. PCR-based identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* with a novel group-specific primer pair[J]. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(10):787-790.

论著

2008年上海市食源性疾病监测

刘弘, 陆屹, 高围激, 陆冬磊, 段胜钢, 吴春峰, 邢之慧, 袁微嘉, 秦璐昕
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

摘要:目的 了解上海市食源性疾病发生情况。方法 采用社区居民食源性腹泻主动症状监测、医院肠道门诊腹泻病人肛拭检测、中小学生对腹泻缺课调查、药店黄连素及诺氟沙星销售量调查及食物中毒暴发事件网络报告等方法综合监测。结果 上海市社区居民食源性腹泻年发生率为26.2‰、就诊率为40.2%, 医院肠道门诊腹泻病人肛拭检测副溶血性弧菌阳性率2.95%、沙门菌阳性率0.53%, 中学生、小学生腹泻缺课率分别为15.91‰、9.97‰, 黄连素销售81 157盒/374 449.07元、诺氟沙星销售21 416盒/80 926.62元, 食物中毒暴发事件16起/488人。监测结果显示5—10月是食源性腹泻高发月份, 同时也为副溶血性弧菌阳性率高峰。结论 上海市食源性疾病监测基本反映出上海市食源性疾病发生处于低水平, 但监测系统在监测对象定义、质量控制方面还需改进。

关键词:食源性疾病; 腹泻; 致病菌; 监测

中图分类号: R37; TS2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)02-0126-06

Surveillance of foodborne disease in Shanghai in 2008

Liu Hong, Lu Yi, Gao Weiwei, Lu Donglei, Duan Shenggang, Wu Chunfeng, Xing Zhihui,
Yuan Weijia, Qin Luxin
(Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective To obtain the data of foodborne disease incidence from a multipurpose surveillance in Shanghai. **Methods** Active symptom surveillance of foodborne diarrhea in community residents, rectal swab test for diarrhea outpatients in hospitals, the absence of students from diarrhea in primary and middle schools, the sale of berberine and norfloxacin in pharmacies and the reports of food poisoning outbreak from networks were applied. **Results** The incidence of foodborne diarrhea in Shanghai community residents was 2.62‰ and the rate of visiting doctors was 40.2%. The positive rate of *Salmonella* and *Vibrio parahaemolyticus* from rectal swabs in diarrhea outpatients were 2.95% and 0.53%, respectively. The absence rate from diarrhea in primary and middle school students were 1.59% and 1.00% respectively. Berberine and norfloxacin sold in pharmacies were 81 157 packages (¥374 449) and 21 416 packages (¥80 927) respectively. Sixteen outbreaks of food poisoning involving 488 people were reported. The results of the surveillance showed that the peak of foodborne diarrhea incidence from May to October was also the peak of positive rate of *Vibrio*

收稿日期: 2010-07-21

作者简介: 刘弘 男 硕士 主任医师 研究方向为营养与食品卫生 Email: hliu@scdc.sh.cn