

间的遗传关系, PFGE 分型技术能展现菌株之间的遗传关系, 但对于反映类似 *orf8* 基因的插入或缺失时常不够灵敏, 因此以 PCR 和 PFGE 的结合来反映 VP 的流行状况不失为一种可行的手段。

参考文献

- [1] Shinoda S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections[J]. *Biocontrol Sci*, 2011, 16(4) :129-137.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Nair G B, Ramamurthy T, Bhattacharya S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1) :39-48.
- [5] Serichantalergs O, Bhuiyan N A, Nair G B, et al. The dominance

- of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhoea in Thailand, and a new emergent serovar (O3: K46) with pandemic traits[J]. *J Med Microbiol*, 2007, 56(5) :608-613.
- [6] Okura M, Osawa R, Iguchi A, et al. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(10) :4676-4682.
- [7] 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.
- [8] 刘弘, 陆屹, 高围激, 等. 2008 年上海市食源性疾病监测[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 32(2) :126-131.
- [9] Bej A K, Patterson D P, Brasher C W, 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.
- [10] Parsons M B, Cooper K L, Kubota K A, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2007, 4(3) :285-292.
- [11] Raghunath P. Genetic markers of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*: are they truly unique?[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2011, 8(5) :653-654.

论著

8 起副溶血性弧菌食物中毒分子流行病学特征分析

刘丽萍¹, 徐岚¹, 李薇薇², 裴晓燕², 郭云昌²

(1. 镇江市疾病预防控制中心, 江苏 镇江 212000; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

摘要:目的 调查并分析镇江及周边部分地区 8 起副溶血性弧菌食物中毒的分子流行病学特征。方法 对经 API 生化鉴定的 40 株副溶血性弧菌进行毒力基因(*tdh* 和 *trh*)及功能基因(*toxRS/new* 和 *orf8*)测定、血清学分型和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型。结果 *tdh* 阳性率为 85.0% (34/40), *trh* 阳性率为 5.0% (2/40), *toxRS/new* 阳性率为 50.0% (20/40), *orf8* 阳性率为 42.5% (17/40); 血清型以 O3: K6 为主; PFGE 分型显示 A~B 群间相似度 >80%。结论 镇江及周边部分地区 8 起食物中毒事件中的副溶血性弧菌主要为 O3: K6 大流行克隆, 且具有高度同源性。

关键词:副溶血性弧菌; 血清型; O3: K6 大流行克隆; 脉冲场凝胶电泳; 食源性致病菌; 食物中毒

中图分类号: R155.3; R181.2; R183.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)01-0009-05

Molecular epidemiology traits of 8 *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning incidents

LIU Li-ping, XU Lan, LI Wei-wei, PEI Xiao-yan, GUO Yun-chang

(Zhenjiang Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Zhenjiang 212000, China)

Abstract: Objective To analyze the molecular epidemiology traits of *Vibrio parahaemolyticus* in Zhenjiang and surrounding areas. **Methods** 40 *Vibrio parahaemolyticus* strains were collected from the samples of food poison incidents occurred in Zhenjiang and surrounding areas in 2011. Biochemical identification, *tdh*, *trh* and *toxRS/new* gene detection, serotyping and pulse-field gel electrophoresis (PFGE) were applied to these strains. **Results** The positive rate of *tdh*, *trh*, *toxRS/new* and *orf8* were 85.0%, 5.0%, 50.0% and 42.5%, respectively. The prevalent serotype was O3: K6 (32/40).

收稿日期: 2013-09-23

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2010350), 镇江市卫生科技重点专项项目 (SH2011068)

作者简介: 刘丽萍 女 主管技师 研究方向为病原生物学 E-mail: 631651115@qq.com

The similarity of PFGE type between group A and B was more than 80%. **Conclusion** Strains from different regions in Zhenjiang and surrounding areas were mainly O3:K6 pandemic clone and highly homologous.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; O3:K6 pandemic clone; pulse-field gel electrophoresis; food-borne pathogens; food poisoning

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种存在于海水产品中的革兰阴性嗜盐弧菌, 感染者多出现发热、呕吐、腹泻等胃肠炎症状^[1]。我国食源性疾病监测网数据显示, VP 食物中毒高居沿海沿江省份微生物食源性疾病首位^[2]。镇江地处我国东部沿海、长江下游南岸, 近5年食源性疾病监测网数据显示, 该地区水产品中 VP 检出率高达 50% 以上, 居江苏省之首^[3]。因此, 收集该地区及周边地区食物中毒事件中的 VP 菌株并开展分子流行病学特征研究, 可为追踪 VP 传播的源头和采取控制措施提供依据。本文主要对镇江及周边部分地区 8 起食物中毒事件中分离的 40 株 VP 进行了毒力基因 (*tdh* 和 *trh*) 及功能基因 (*toxRS/new*、*orf8*) 测定、血清学分型和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

从镇江及周边部分地区 2011 年发生的 8 起食物中毒事件中采集 40 株 VP, 所有菌株均经 API 20E 生化试条鉴定, 其中 35 株来源于患者, 5 株来源于食品。鉴定及 PCR 试验中的阳性对照菌株为 RIMD

2210633。PFGE 试验中相对分子量标准沙门菌 Braenderup 血清型菌株 H9812。

1.1.2 仪器与试剂

eppendorf 梯度 PCR 仪、CHEF-mapper 脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR 凝胶成像系统、BioMérieux Vitek 浊度计、水浴恒温振荡器、纯水仪。

API 20E 及配套试剂 (法国梅里埃)、副溶血性弧菌诊断血清 (日本生研公司)、即用型 *Taq* 酶 PCR 试剂盒 (上海捷瑞生物工程有限公司)、脑心浸液肉汤, 脑心浸液琼脂, 蛋白酶 K (德国 Merck), 限制性内切酶 *Xba* I、*Sfi* I (美国 Promega), CSB (细胞悬浮液), SKG (Seakem Gold) 琼脂糖, EDTA, TE 缓冲液, 15 ml 离心管, EB (溴化乙锭) 染液。

1.2 方法

1.2.1 PCR 法测定 *tdh*、*trh*、*toxRS/new* (GS-PCR)

tdh、*trh*、GS-PCR、*orf8* 引物及反应条件见表 1, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。PCR 扩增在 25 μ l 反应体系中进行: 1 μ l DNA (50 ng/ μ l), 12.5 μ l 2 \times *Taq* 酶 PCR Mix, 引物各 1 μ l (10 μ mol/ μ l), 9.5 μ l 灭菌蒸馏水。扩增反应在梯度 PCR 上进行, 产物经 1% 琼脂糖凝胶 90 V 电泳 50 min 后在凝胶成像系统中观察结果。当 *tdh*⁺、*trh*⁻、*toxRS/new*⁺ 或 *orf8*⁺ 时, 判定为大流行菌群。

表 1 *tdh*、*trh*、GS-PCR、*orf8* 基因检测引物序列和反应条件

Table 1 PCR for *tdh*、*trh*、GS-PCR、*orf8* genes

目的基因	引物	引物序列 (5'-3')	反应条件	产物大小/bp
<i>tdh</i> ^[4]	<i>tdh</i> -F ^a	ATATCCATGTTGGCTGCATTC	94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s,	531
	<i>tdh</i> -R ^b	TTATGTGTTGATGTTACATTCAAAA	72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min	
<i>trh</i> ^[4]	<i>trh</i> -F ^a	ATGAAACTAAAACCTACTACTTTC	94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s,	553
	<i>trh</i> -R ^b	TTAATTTTGTGACATACATTCAT	72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min	
<i>toxRS/new</i> ^[5]	GS-VP1	TAATGAGGTAGAAACA	94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 复性 30 s,	651
	GS-VP2	ACGTAACGGGCTACA	72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min	
<i>orf8</i> ^[5]	<i>orf8</i> -F ^a	GTTCCGATACAGTTGAGG	94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45 $^{\circ}$ C 复性 30 s,	700
	<i>orf8</i> -R ^b	AAGTACAGCAGGAGTGAG	72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min	

注: F^a 表示上游引物; R^b 表示下游引物

1.2.2 血清学分型

根据日本生研公司的 VP 诊断血清 (74 种 K 血清、11 种 O 血清) 使用说明书进行血清凝集试验。K 抗原玻片凝集试验: 将培养 16 h 的纯菌制成菌悬液, 用菌悬液与 K 血清进行凝集, 观察结果, 如果不凝集, 将该菌定为 K 无法分型 (用 KUT 表示), 同时用生理盐水做对照试验。O 抗原玻片凝集试验: 将培养 16 h 的纯菌制成菌悬液, 对菌悬液 121 $^{\circ}$ C 高压

灭菌 1 h, 4 000 r/min 离心 15 min (离心半径 8 cm), 弃上清, 用生理盐水洗涤沉淀, 离心后用少量生理盐水将沉淀制成菌悬液, 与 O 血清进行凝集试验, 如果 O 抗原均不凝集, 则 O 抗原未知。

1.2.3 脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型

根据美国 PulseNet 霍乱弧菌 PFGE 的标准分型方法及其优化的方法^[6-7] 进行分型试验。挑取适量培养 18 h 的新鲜菌落溶于 CSB 溶液中制备成透

光度为 20% 的菌悬液。取 200 μ l 菌悬液,加入 10 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml)和 200 μ l 溶化的 56 $^{\circ}$ C 的 Seakem Gold 琼脂糖(1%),制备胶块。用含蛋白酶 K 的细胞裂解液裂解胶块中包被的细菌,分别用超纯水和 TE 缓冲液洗涤。然后切取 2 mm 宽的 Plug,用限制性内切酶 Sfi I 50 $^{\circ}$ C 酶切 4 h。酶切好的胶块置于梳子齿上,倒入溶化的 1% Seakem Gold 琼脂糖,制胶。使用 CHEF-mapper XA 型脉冲场凝胶电泳槽电泳,电泳条件为:low MW-78kb、high MW-396 kb,电泳时间 19 h,起始转换时间 18 s,终止电泳时间 35 s。电泳后在 1 μ g/ml 的 EB 溶液中染色 30 min,用超纯水脱色 30 min。GEL DOC XR 凝胶成像系统拍摄图像,图谱导入 BioNumerics 软件,以 Xba I 酶切的 H9812 作为统一的分子量标准进行校准,确定条带位置。用非加权配对算数平均法(UPGMA)进行聚类分析,条带位置差异容许度和优化度分别设为 1.00 和 0.50,不同菌株之间的电

泳条带相似系数用 Dice 表示,范围在 0 ~ 100 之间,0 表示完全不相关,100 表示完全相同,出现不同的条带即判定为不同的型。

2 结果

2.1 PCR 法基因测定

40 株菌中,*tdh* 阳性、*trh* 阳性、*tdh* 和 *trh* 均阳性检出率分别为 85.0% (34/40)、5.0% (2/40)、5.0% (2/40);*toxRS/new* 阳性 20 株(占 50.0%),*orf8* 阳性 17 株(占 42.5%);大流行菌群(PG)18 株,其中 *toxRS/new* 和 *orf8* 均阳性 9 株,*toxRS/new* 阳性、*orf8* 阴性 5 株,*toxRS/new* 阴性、*orf8* 阳性 4 株,非大流行菌群(NPG)22 株,见表 2。

2.2 血清学分型

40 株菌血清型以 O3:K6 为主(32/40)(其中 2 株为食品株),O10:K24、O1:K56、O1:KUT、O1:K41 各 1 株,4 株菌未能定型(其中 3 株为食品株),见表 2。

表 2 40 株 VP 的流行病学特征表
Table 2 Epidemiology traits of 40 strains

菌株编号	样品类型	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS/new</i>	<i>orf8</i>	大流行菌群	血清型	PFGE 群别	采样地点	采样时间	暴发次数
ZJ35	食品	-	-	+	-	NPG	未定型	C 群	镇江	2011.5	1
ZJ36	患者	-	-	+	+	NPG	未定型	C 群	镇江	2011.5	1
ZJ37	患者	+	-	-	+	PG	O3:K6	B 群	镇江	2011.5	1
ZJ38	患者	+	-	+	+	PG	O3:K6	B 群	镇江	2011.5	1
ZJ39	患者	+	-	+	-	PG	O3:K6	B 群	镇江	2011.5	1
ZJ40	患者	-	-	+	+	NPG	O10:K24	C 群	镇江	2011.5	1
ZJ41	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	B 群	镇江	2011.5	1
ZJ42	食品	-	-	-	-	NPG	未定型	A 群	镇江	2011.7	2
ZJ43	食品	-	-	+	+	NPG	未定型	C 群	镇江	2011.7	2
ZJ44,ZJ45	患者	+	-	+	+	PG	O3:K6	B 群	镇江	2011.7	2
ZJ46	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	B 群	镇江	2011.7	2
ZJ47	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	A 群	镇江	2011.11	3
ZJ48-ZJ50	患者	+	-	+	+	PG	O3:K6	A 群	镇江	2011.11	3
ZJ51-ZJ54	患者	+	-	+	-	PG	O3:K6	A 群	镇江	2011.11	3
ZJ55	患者	+	+	+	+	NPG	O3:K6	A 群	镇江	2011.11	3
ZJ56,ZJ57	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	A 群	镇江	2011.11	3
ZJ58	食品	+	-	+	+	PG	O3:K6	A 群	镇江	2011.11	3
ZJ59	食品	+	-	+	+	PG	O3:K6	B 群	镇江	2011.11	3
ZJ60,ZJ61	患者	+	-	+	+	PG	O3:K6	B 群	扬州	2011.7	4
ZJ62	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	B 群	常熟	2011.5	5
ZJ63	患者	+	-	-	-	NPG	O1:K41	D 群	常熟	2011.5	5
ZJ64	患者	+	-	-	-	NPG	O1:K56	C 群	常熟	2011.6	6
ZJ65	患者	+	-	-	-	NPG	O1:KUT	A 群	常熟	2011.6	6
ZJ66,ZJ67	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	A 群	常熟	2011.6	6
ZJ68	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	A 群	常熟	2011.6	7
ZJ69-ZJ70	患者	+	-	-	-	NPG	O3:K6	B 群	常熟	2011.6	7
ZJ71	患者	-	-	-	-	NPG	O3:K6	C 群	常熟	2011.6	7
ZJ72,ZJ73	患者	+	-	-	+	PG	O3:K6	C 群	常熟	2011.8	8
ZJ74	患者	+	+	+	-	NPG	O3:K6	A 群	常熟	2011.8	8

2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型

40 株菌的酶切条带分子量主要集中在 30 ~ 700 kb 之间,基因组 DNA 被限制性内切酶 Sfi I 酶切的条带数为 14 ~ 19 条,共切出 12 条不同的带型。

将酶切图像的数据导入 BioNumerics,根据 Tenover 等人^[8]引入的标准,Sfi I 酶切将 40 株菌分成 4 个 PFGE 群,其中 A、B 群是优势群,占菌株数量的 77.5%,A ~ B 群间相似度 > 80%。Dice 相关系数

及树状图见图 1。

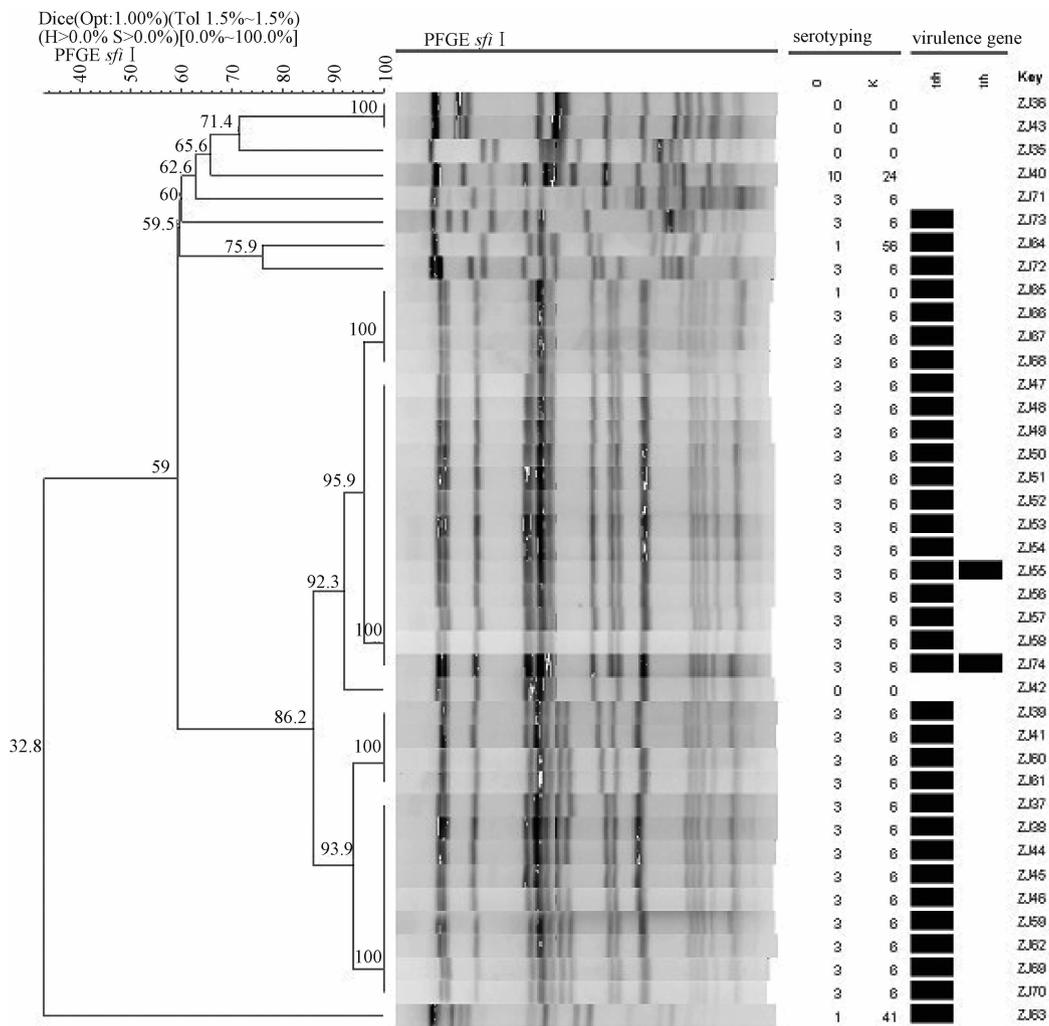


图 1 40 株 VP 的 PFGE 分型聚类树状图(Sfi I 酶切)

Figure 1 PFGE pattern of *Vibrio parahaemolyticus*(restriction enzyme *Sfi* I)

3 讨论

耐热直接溶血素(*tdh*)和溶血相关溶血素(*trh*)是 VP 主要的毒力因子^[9],临床分离株大多有 *tdh* 和/或 *trh* 基因,环境分离株则极少携带^[9-10],根据是否携带毒力基因,VP 可分为致病株和非致病株。*toxRS/new* 是 VP *toxRS* 操纵子上所含的一段独有序列,该序列编码跨膜蛋白并参与毒力相关基因的调节^[11],*toxRS/new* 基因是判断 VP 是否属于大流行菌群(pandemic group)(即高致病株)的重要指标之一。一种丝状噬菌体(*φ237*)被认为与 VP 大流行菌群有关,这种丝状噬菌体拥有唯一的开放阅读框 *orf8*,Nasu 等^[5]推测 *orf8* 编码一种黏附蛋白,这种黏附蛋白增加了 VP 黏附于人类肠道细胞或增加了黏附于海生植物表面的能力。因此,判断一株 VP 是否属于大流行菌群的依据为 *tdh*⁺、*trh*⁻、*toxRS/new*⁺ 或 *orf8*⁺^[5,11-12]。

VP 因鞭毛 H 抗原特异性低,血清分型以菌体 O 抗原和荚膜 K 抗原进行组合,目前报道有 13 种 O 抗原和 71 种 K 抗原。1996 年 O3:K6 型 VP 在印度加尔各答引起食物中毒大爆发后,在中国台湾、日本、美国和智利等沿海地区蔓延,形成了所谓 O3:K6 大流行克隆(pandemic clone),除 O3:K6 外,还包括 O4:K68、O1:KUT 等其他血清衍生型菌株,O3:K6 大流行克隆在沿海地区流行导致世界范围内 VP 的感染人数急剧上升^[13]。

本研究检出的 18 株大流行菌群 VP 的血清型均为 O3:K6,其中 16 株属于 PFGE 分型 A 群,2 株为 B 群,8 起食物中毒事件中有 5 起检出的 VP 均属于 O3:K6 大流行菌群,提示镇江及周边部分地区致病性 VP 主要为 O3:K6 大流行克隆。非大流行菌群中 1 株 O1:KUT 与 3 株 O3:K6(ZJ66、ZJ67、ZJ68)基因型完全一致。根据 Nair 等^[13]提出的“血清型变异”假说,即与优势菌群 O3:K6 有相同基因型和分子特征的其他型菌群是由同一株 O3:K6 菌株 O、K 抗原变异而来,

VP 因鞭毛 H 抗原特异性低,血清分型以菌体

这些菌株构成了 O3:K6 菌群,提示该株 O1:KUT 可能是由 O3:K6 变异而来,可归属于 O3:K6 菌群。4 株非大流行菌群与 7 株 O3:K6 大流行菌群(ZJ48~ZJ54)高度同源(Dice 相关系数为 95.9%),说明 VP 在传播过程中可能由于环境变化或宿主免疫压力发生了基因变异,从非大流行菌群变异为大流行菌群,进而形成了 O3:K6 大流行克隆。

本研究发现,同一次食物中毒事件中分离的菌株 PFGE 图谱并非完全一致,提示食品中可能存在多个克隆的致病性 VP,可能由于检测方法灵敏度等原因未被检出^[14]。研究还发现,不同时间、地点食物中毒事件中菌株的 PFGE 图谱存在一致的情形(如 ZJ58 和 ZJ74;ZJ36 和 ZJ43;ZJ37、ZJ44、ZJ59、ZJ62 和 ZJ69),且优势菌群 A~B 群间相似度 >80%,提示镇江及周边部分地区可能存在共同的污染源。通过建立 PFGE 图谱数据库,对食物中毒事件中菌株图谱进行溯源,如能找出污染源并进行消毒,可降低或消除 VP 食物中毒事件的发生。

参考文献

- [1] Yeung P S M, Boor K J. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2004, 1(2): 74-88.
- [2] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992—2001 年食源性疾病暴发资料分析—国家食源性疾病预防网 [J]. *卫生研究*, 2004, 33(6): 725-727.
- [3] 刘丽萍,徐岚,何晓砚,等. 镇江市市区市售食品中食源性致病菌检测情况分析 [J]. *实用预防医学*, 2009, 16(6): 1835-1837.
- [4] CHAO G, JIAO X, ZHOU X, 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(6): 1021-1028.
- [5] Tlida, A Hattori, K Tagomori, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 2156-2161.
- [6] Parsonss M B, Cooper K L F, Kubota K A, et al. PulseNet USA standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2007, 4(3): 285-292.
- [7] Kam K M, Luey C K Y, Parsonss M B, et al. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(8): 2766-2773.
- [8] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, 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.
- [9] Taniguchi H, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Microb Pathogen*, 1986, 1(5): 425-432.
- [10] Nishibuchi M, Kaper J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(6): 2093-2099.
- [11] Okura M, Ro Osawa R, Iguchi A, et al. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(10): 4676-4682.
- [12] Iida T, Hattori A, Tagomori K, et al. Filamentous phage associated with recent pandemic isolates of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3): 477-478.
- [13] Nair G B, Ramamurthy T, Bhattacharya S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 and its serovariants [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1): 39-48.
- [14] 李薇薇,裴晓燕,朱海明,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): 239-243.

· 法规文件 ·

国家卫计委关于印发《新食品原料申报与受理规定》和《新食品原料安全性审查规程》的通知

各省、自治区、直辖市卫生厅局(卫生计生委),新疆生产建设兵团卫生局,委直属有关单位:

为规范新食品原料安全性审查和许可工作,根据《中华人民共和国食品安全法》和《新食品原料安全审查管理办法》的规定,我委组织制定了《新食品原料申报与受理规定》和《新食品原料安全性审查规程》。现印发给你们,请遵照执行,并将执行中的有关问题及时反馈我委。

(相关链接:<http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s3585/201311/e8dc7f4ec58444f8bbf32ec079d7e905.shtml>)