

论著

浙江省 369 份淡、海水鱼香港海鸥型菌污染状况研究

梅玲玲¹ 高雯洁² 朱 敏¹ 潘军航¹ 张俊彦¹ 汪 炜¹ 姜德霞¹ 张严峻¹

(1. 浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310009; 2. 嘉兴市疾病预防控制中心,浙江 嘉兴 314000)

摘要:目的 掌握浙江省淡、海水鱼中香港海鸥型菌污染状况,为防止食源性香港海鸥型菌病的发生和流行提供科学依据。方法 用改良头孢哌酮麦康凯琼脂分离,API 20NE 鉴定香港海鸥型菌。K/B 纸片扩散法作耐药性测定。通用引物扩增 16S rDNA 并与香港海鸥型菌 HKU1 株开展同源性比较。结果 369 份样品检出香港海鸥型菌 18 株,阳性率为 4.88%,其中,鲤鱼检出率为 25.00%,草鱼的阳性率为 10.26%,海水鱼以及鲫鱼、鲢鱼、扁鱼等淡水鱼中未分离出。分离的香港海鸥型菌 16S rDNA 序列与 HKU1 株仅相差 1~2 个碱基,同源性在 99.6%~100.0%之间;18 株菌对头孢拉定、万古霉素、甲硝唑、克林霉素、头孢哌酮完全耐药,对红霉素、亚胺培南、克拉霉素、氨基曲南、庆大霉素、丁胺卡那霉素、三甲氧苄氨嘧啶、四环素、氯霉素、多粘菌素 B、环丙沙星完全敏感,对头孢噻吩、胺苄西林、头孢曲松的耐药性分别为 83.33%、61.11%和 5.56%。结论 浙江省存在香港海鸥型菌污染源,建议相关监督部门应加大这类产品的管理力度,防止香港海鸥型菌病在我省的发生和传播。

关键词:鱼类;香港海鸥型菌;食品污染;抗药性;微生物;DNA;核糖体

Survey of *Laribacter hongkongensis* Contamination with 369 Samples of Freshwater Fish and Marine Fish Caught in Zhejiang Province

MEI Ling-ling, GAO Wen-jie, ZHU Min, PAN Jun-hang, ZHANG Jun-yan, WANG Wei, JIANG De-xia, ZHANG Yan-jun

(Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310009, China)

Abstract : Objective To find out the practical situation of *Laribacter hongkongensis* contamination in fresh water and sea fishes in Zhejiang Province so as to provide scientific base for the prevention of food-born infection by *Laribacter hongkongensis*. **Method** *Laribacter hongkongensis* was isolated by modified Mac-Lonkey Agar (with 32 µg cefoperazone/ml), and identified by API 20NE. 16S rDNA were amplified by general primer and homologous comparison with *Laribacter hongkongensis* strain HKU1 was carried out. **Results** 18 strains of *Laribacter hongkongensis* were isolated from the 369 samples. The over-all positive rate was 4.88%. The positive rate in carp was 25.00% and in grass carp 10.26%. The *Laribacter hongkongensis* was not found in sea fish and other fresh water fishes such as crucian, chub and ponfret. The sequence of 16S rDNA isolated from *Laribacter hongkongensis* was only 1-2 base pair different from that of the HKU1 strain, a homology as high as 99.6%~100.0%. Antibiotics resistance test showed that the 18 strains of *Laribacter hongkongensis* isolated in the present experiment were completely resistant to Ceftazidime, Vancomycin, Metronidazole, Clindamycin and Cefuroxime, but completely sensitive to Erythromycin, Imipenem, Clarithromycin, Azetreonam, Gentamicin, Amikacin, Trimethoprim, Tetraciline, Chloromycetin, Polymyxin B and Ciprofloxacin. The resistance to Cephalothin, Ampicillin and Ceftriaxone were 83.33%, 61.11% and 5.56%, respectively. **Conclusion** There exists contamination source of *Laribacter hongkongensis* in Zhejiang Province. Related monitoring departments should increase supervising strength on this category of food to prevent the occurrence and prevalence of *Laribacter hongkongensis* in Zhejiang province.

Key word: Fishes; *Laribacter hongkongensis*; Food Contamination; Drug Resisitance, Microbial; DNA, Ribosomal

香港海鸥型菌 (*Laribacter hongkongensis*) 是一种可致人腹泻、甚至严重肠胃炎的新病菌。异地旅游时出现腹泻可能与其有密切关系。感染途径推测是由于食入未煮熟的鱼肉或是交叉污染的食物^[1]。该菌自 2001 年由香港大学发现、美国微生物学协会权

威杂志 Journal of Clinical Microbiology 发表的相关论文确定该菌为新发现细菌菌种,目前该菌已在我国内地、日本、瑞士及中美洲的古巴等国肠胃炎病人粪便中或草鱼、鳙鱼等样品中检出,表明该病已在全球广泛传播^[2]。

为了掌握浙江省淡、海水鱼中香港海鸥型菌污染状况,防止食源性香港海鸥型菌病的发生和流行,作者于 2005 - 2006 年对浙江省内养殖和销售的草

基金项目:中国疾病预防控制中心专项资金
作者简介:梅玲玲 女 主任技师

鱼、鲤鱼、鲫鱼、小黄鱼等淡水、海水鱼共计 369 份样品开展了香港海鸥型菌污染状况研究,并对分离的香港海鸥型菌进行了耐药性检测,与从香港病人中分离的香港海鸥型菌 HKU1 株进行了 16S rDNA 序列同源性比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 样品分别采自浙江省杭州、舟山、嘉兴市水产批发市场、农贸市场和养殖场,淡水鱼包括草鱼、鲤鱼、鲫鱼、白鲢、花鲢、扁鱼,共计 329 份,海水鱼包括小黄鱼、昌扁鱼,共计 40 份(表 1)。

表 1 369 份鱼类产品采样表

鱼种	采样场所	杭州市	嘉兴市	舟山市	合计
草鱼	水产市场、养殖场	46	35	0	76
鲤鱼	水产市场、养殖场	5	35	0	40
鲫鱼	水产市场、农贸市场	133	10	0	143
鲢鱼	水产、农贸市场和养殖场	35	10	0	45
扁鱼	水产、农贸市场和养殖场	21	10	0	31
海水鱼	水产市场、农贸市场	0	0	40	40
其他鱼种	水产、农贸市场和养殖场	27	0	0	27
合计		229	100	40	369

1.1.2 试剂 改良头孢哌酮麦康凯琼脂使用北京陆桥技术责任有限公司的干粉配制麦康凯琼脂,临用时加热融化琼脂,加入 1% 葡萄糖和 32 mg/L 的头孢哌酮(Cefoperazone),混合均匀后倾注平板备用;细菌生化测试条 API 20NE 由法国生物梅里埃公司提供;大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 购自中国微生物菌种保藏中心;API 20NE 鉴定条购自法国生物梅里埃公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒和 TaKaRa Taq 试剂盒由大连宝生物工程有限公司提供。

1.1.3 抗生素 选择头孢拉定(CE 30 μg/片)、头孢曲松(CRO 30 μg/片)、红霉素(E 15 μg/片)、亚胺培南(IPM 10 μg/片)、克拉霉素(CLR 15 μg/片)、氨曲南(ATM 30 μg/片)、庆大霉素(CN 10 μg/片)、头孢噻吩(KF 30 μg/片)、胺苄西林(AMP 10 μg/片)、万古霉素(VA 30 μg/片)、甲硝唑(MTZ 5 μg/片)、丁胺卡那霉素(AK 30 μg/片)、三甲氧苄氨嘧啶(SXT 25 μg/片)、四环素(TE 30 μg/片)、氯霉素(C 30 μg/片)、多粘菌素 B(PB 300 U/片)、克林霉素(DA 2 μg/片)、环丙沙星(CIP 1 μg/片)、头孢哌酮(CFP 30 μg/片)共 19 种抗生素药敏纸片,购自 OXOID 公司。

1.2 方法

1.2.1 香港海鸥型菌分离鉴定 将鱼肠后段、中段

内容物分别直接涂布于改良头孢哌酮麦康凯琼脂,37 ℃ 需氧培养 48 h。挑取 1 mm 左右、浅灰色半透明、中间突起的扁平菌落,接种三糖铁斜面,同时分离于血平板,37 ℃ 培养 24 h 后,三糖铁不变色、脲酶、氧化酶阳性、革兰染色镜检为革兰阴性、无芽孢、无荚膜呈海鸥状或螺旋杆状者,进一步用 API 20NE 的作生化鉴定,凡生化特性完全符合表 2 的菌株判为香港海鸥型菌。

表 2 香港海鸥型菌生化特性

生化反应或酶	结果	生化反应或酶	结果
硝酸盐还原(NO ₃)	+	甘露醇(MAN)	-
色氨酸(TRY)	-	N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)	-
葡萄糖酸化(GLU)	-	麦芽糖(MAL)	-
精氨酸双水解酶(ADH)	+	葡糖酸盐(GNT)	-
脲酶(URE)	+	癸酸盐(CAP)	+
七叶灵水解(ESC)	-	己二酸(ADI)	+
明胶酶(GEL)	-	苹果酸盐(MLT)	+
半乳糖苷酶(PNPG)	-	柠檬酸盐利用(CTI)	-
葡萄糖(GLU)	-	乙酸苯酯(PAC)	-
阿拉伯糖(ARA)	-	细胞色素氧化酶(OX)	+
甘露糖(MNE)	-		

注: - 表示阴性, + 表示阳性。

1.2.2 香港海鸥型菌耐药性试验 采用 WHO 推荐的 K-B 纸片扩散法测定。用接种环挑取经纯化、传代的香港海鸥型菌接种于营养肉汤中,(36 ± 1) 培养 8 h,用生理盐水校正菌液浓度至 0.5 麦氏比浊标准,用无菌棉均匀涂布接种于 M-H 琼脂平板表面,置室温干燥 3 ~ 5 min 后,用纸片分配器将含药纸片贴于含菌琼脂平板表面。平板经室温放置 15 min 再倒放于 37 ℃ 培养箱中培养 48 h 后,测量抑菌环直径并记录结果。用大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作质控,判定标准按美国 CLSI/NCCLS M100 - S15 Vol. 25 No. 1 抗微生物药物敏感性试验执行标准(2005 版),肠杆菌科抑制圈直径的解释标准执行。

1.2.3 16S rDNA 基因序列分析 DNA 提取按试剂盒操作说明进行。用于扩增细菌 16S rDNA 的通用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,16SF:5' ADA DTT TGA TCA CGG CTC AG 3';16SR:5' ACG GIT ACC TTG TTA CGA CTT 3' [3]。

PCR 反应体系 5 U/μl TaqDNA 聚合酶 0.7 μl、10 × PCR Buffer 10 μl、25 mmol/L MgCl₂ 6.5 μl、2.5 mmol/L dNTP 8 μl、模板 DNA 约 100 ng、5 μmol/L 上下游引物各 5 μl,加 ddH₂O 至总体积达到 100 μl。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 10 min,接着 94 ℃ 30 s,

52 30 s, 72 60 s, 35 个循环; 72 延伸 5 min。用 ddH₂O 代替模板 DNA 做阴性对照。扩增产物于加入 EB 的 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察扩增效果。对于扩增效果良好且足量的试样用凝胶回收试剂盒进行回收, 回收产物委托杭州华大基因研发中心测定序列。用 DNAMAN 软件与 NCBI 中发布的香港海鸥型菌 16S rDNA 序列进行序列同源性分析。

2 结果

2.1 369 份淡、海水鱼香港海鸥型菌检测结果 检测的 76 份草鱼、40 份鲤鱼、143 份鲫鱼、45 份鲢鱼、31 份扁鱼以及 24 份其他淡水鱼、40 份小黄鱼、昌扁鱼等海水鱼中, 共有 18 份鱼检测到香港海鸥型菌, 阳性率为 4.88%, 其中, 40 份鲤鱼中有 10 份样品分离到香港海鸥型菌, 检出率达 25.00%。8 份草鱼检出香港海鸥型菌, 阳性率为 10.26%。鲫鱼、鲢鱼、扁鱼、海水鱼等未分离到香港海鸥型菌。

2.2 16S rDNA 基因序列分析结果 用 ABI prism 3730 DNA 自动测序仪对 18 株分离的香港海鸥型菌用双链作模板进行相对方向的序列测定, 去掉重叠区域和引物区, 得到的 16S rDNA 的序列长度在 707 ~ 946 bp 之间。将所测序列与 GenBank 中登录的香港海鸥型菌 HKU1 株进行同源性比较, 18 株细菌中, 有 4 株 DNA 序列与香港海鸥型菌 HKU1 株完全同源, 有 7 株与 HKU1 株仅相差 1 个碱基, 还有 7 株菌与 HKU1 株有 2 个碱基的差异, 同源性在 99.6% ~ 100.0% 之间。

2.3 耐药性检测结果 本次分离的 18 株香港海鸥型菌对头孢拉定、万古霉素、甲硝唑、克林霉素、头孢哌酮完全耐药, 对头孢噻吩的耐药性为 83.33%, 对胺苄西林的耐药性为 61.11%, 对头孢曲松的耐药性为 5.56%, 对红霉素、亚胺培南、克拉霉素、氟喹诺酮、庆大霉素、丁胺卡那霉素、三甲氧苄氨嘧啶、四环素、氯霉素、多粘菌素 B、环丙沙星完全敏感(表 3)。

3 讨论

香港海鸥型菌属原核细菌 (*Proteobacteria*) 亚纲, 奈瑟球菌科。该菌最先由港大医学院 Teng 和 Woo 等在 1 名高烧和呼吸短促的肝硬化病人血液和胸腔脓汁中分离到, 一系列生物化学分析和分子生物学检测表明该菌属新发细菌。随着对该菌的深入研究, 在多名香港腹泻病人的粪便中分离到该菌的不同菌株, 并被命名为香港海鸥型菌^[1]。相关研究表明在香港该菌只存在淡水鱼中, 在其他肉类食品未发现该菌的存在, 其中含该菌最多的是草鱼

表 3 18 株香港海鸥型菌耐药性检测结果

名称	浓度	耐药株数	中敏株数	敏感株数	耐药率 (%)
头孢拉定 (CE)	30 μg/片	18	0	0	100.00
头孢曲松 (CRO)	30 μg/片	1	3	14	5.56
红霉素 (E)	15 μg/片	0	0	18	0.00
亚胺培南 (IPM)	10 μg/片	0	0	18	0.00
克拉霉素 (CLR)	15 μg/片	0	0	18	0.00
氟喹诺酮 (ATM)	30 μg/片	0	0	18	0.00
庆大霉素 (CN)	10 μg/片	0	0	18	0.00
头孢噻吩 (KF)	30 μg/片	15	3	1	83.33
胺苄西林 (AMP)	10 μg/片	11	3	5	61.11
万古霉素 (VA)	30 μg/片	18	0	0	100.00
甲硝唑 (MIZ)	5 μg/片	18	0	0	100.00
丁胺卡那霉素 (AK)	30 μg/片	0	0	18	0.00
三甲氧苄氨嘧啶 (SXT)	25 μg/片	0	0	18	0.00
四环素 (TE)	30 μg/片	0	0	18	0.00
氯霉素 (C)	30 μg/片	0	0	18	0.00
多粘菌素 B (PB)	300 U/片	0	0	18	0.00
克林霉素 (DA)	2 μg/片	18	0	0	100.00
环丙沙星 (CIP)	1 μg/片	0	0	18	0.00
头孢哌酮 (CFP)	30 μg/片	18	0	0	100.00

和^[2] 鱸鱼, 并认为该菌在东南亚一带可能广泛存在, 传播途径可能是食用污染的鱼或交叉污染的食品。以本次对淡、海水鱼的研究看, 浙江省的情况与 Teng 等报道的基本一致, 海水鱼中未分离到香港海鸥型菌, 淡水鱼中的鲤鱼、草鱼携带香港海鸥型菌, 且带菌率不低, 其中鲤鱼的检出率高达 25%, 提示我省存在香港海鸥型菌感染的危险。

16S rDNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA 的 DNA 序列, 存在于细菌等原核生物的染色体基因中, 具有多拷贝, 多信息, 长度适中, 能够体现不同菌属之间的差异, 使用通用引物能够较容易利用 16S rDNA 基因序列对细菌进行菌种鉴定的特点, 目前在识别异常细菌引起的疾病上扮演着重要的角色^[3]。在细菌分类中, 如《伯杰氏系统细菌学手册》, 也越来越多地选择 16S rDNA 基因序列作为分类的依据。本研究将 18 株分离菌株进行 16S rDNA 扩增, 测序产物与已发表序列进行比对表明各菌株与已知菌的同源性均在 99% 以上, 从而进一步印证了本次分离的菌株与香港大学发现的香港海鸥型菌为同一种菌。

据报道, 在香港分离的香港海鸥型菌对胺苄西林、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢拉定、头孢曲松、亚胺培南、氟喹诺酮、红霉素、克拉霉素、庆大霉素、丁胺卡那霉素、环丙沙星、氯霉素、四环素、多粘菌素 B 等抗生素敏感; 对万古霉素、克林霉素、甲硝唑、头孢哌酮耐药^[4]。本次监测的浙江省内分离的香港海鸥型菌除对万古霉素、克林霉素、甲硝唑、头孢哌酮完全

论著

同类场所的食品安全信息收集工具评估

方月华 邓志豪

(澳门特区政府卫生局疾病预防控制中心,澳门)

摘要:目的 对现时卫生局执行食品卫生检查所使用的工具进行评估。方法 以问卷访谈及观察比较评估卡及通知笔录表的使用性及适用性对数据收集的质量影响评估。结果 成功访问了24名卫生检查员,占合格受访者92%。评估卡、通知笔录表分别属于定序及定类的检查评估表,两表在同类场所的使用率均达100%,个别地区卫生工作组(3/7; 42.9%)以评估卡作为非同类场所的卫生检查,使用率较原先设计的评估卡使用范围超出近30%。在检查项目内容方面,参照美国疾病预防控制中心的相关数据,两评估表的关键点各占总项的12.9%及11.1%;相对其他国家地区同类型的检查表,关键点平均相差少38.3%及40.1%,内容亦欠缺个人卫生、时间及温度三方面的关键点。在项目内容的评核方面,受访者对同一场所中“垃圾”及“食物安放”两检查项的评核分数似出现离散现象,其中,高年资的受访者“垃圾”检查项集中在2分至1分,低年资受访者则由4分至2分不等,但两者差异并无统计学意义($p > 0.05$)。在信息收集工具的选取方面,90%以上的卫生检查员认为通知笔录表较评估卡更适用于日常的卫生稽查,然而,一半以上的卫生检查员亦认为评估卡的量化检查及总分评估皆有助对场所的食品安全卫生进行整体评估。结论 评估表的标准化以及内容的调整是目前食品安全信息数据收集品质的迫切改善问题;当中,适当的引入关键控制点是提升数据品质的根本源。另外,随着饮食业的不断变化,合并两信息收集工具及扩大评估表的使用范围将有利于整个食品安全监测网的完善发展。

关键词:食品;安全;公共卫生信息学;数据收集

Evaluation of Information Collecting Tools to Food Safety of Similar Establishment

FONG Ut-wa, TANG Chi-ho

(Centers for Disease Control and Prevention, Health Bureau, Macao SAR, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the food hygiene inspection tools that are nowadays implemented by Health Bureau. **Method** Questionnaire interviews and observation were used to compare the usability and applicability of assess card and inspection record that affect the quality of data collection. **Results** A total of 24 inspectors who was of 92% eligible for the study completed with the interview. Access card and inspection record were respectively belonged to ordinal and nominal evaluative inspection

耐药外,对头孢拉定、头孢曲松、头孢噻吩、胺苄西林均有一定的耐药性,其中对头孢拉定的耐药性为100%。表明浙江省分离的香港海鸥型菌耐药性更强,危险性更大。由于香港海鸥菌引起的急性胃肠炎主要是由淡水鱼产品介导的,因此淡水鱼产品“从养殖到餐桌”各环节都有被污染的可能性,故监测淡水鱼产品中香港海鸥菌污染及其流行趋势,加强预警和预防是控制暴发的关键。

参考文献

[1] YUEN K Y, WOO P C Y, TENG J L L, et al. *Laribacter hongkongensis*

gen. nov., sp. nov., a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(12): 4227-4232.

[2] JADE L L TENG, PATRICK C Y WOO, SHIRLEY S, et al. Ecoepidemiology of *Laribacter hongkongensis*, a novel bacterium associated with gastroenteritis [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(2): 919-922.

[3] WEISSBURG W G, BARNES S M. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(6): 697-703.

[4] WOO P C Y, PETER K, ANDR P B, et al. *Laribacter hongkongensis*: a potential cause of infectious diarrhea [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003, 47(4): 551-556.

[收稿日期: 2007-01-22]

中图分类号: R15; S965; R378 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2007)04-0300-04

作者简介: 方月华 女 高级技术员