

(1):69-79.

[14] 柯丹枫,张永慧.广东养殖牡蛎的诺如病毒污染状况的调查[J].中华疾病控制杂志,2012,16(10):881-884.

[15] BURKHARDT W, CALCI K R. Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness [J]. Applied and

Environmental Microbiology, 2000, 66(4):1375-1378.

[16] 陈玲霞,姬莉莉,孙建飞. 2013—2015年北京市怀柔区病毒性腹泻病原及流行病学分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(5):603-605.

风险监测

顺义区市售双壳贝类中副溶血性弧菌和诺如病毒的耐药性及分型研究

王园园,李颖,杨杰,王苗

(北京市顺义区疾病预防控制中心,北京 101300)

摘要:目的 了解北京市顺义区部分市售双壳贝类中副溶血性弧菌及诺如病毒的污染情况,为相关感染性腹泻的防治提供依据。方法 2017年7~10月采集顺义区市场的双壳贝类,取适量样品分离其消化腺,进行样品前处理,提取病毒RNA后采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测诺如病毒。剩余样品按照GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》进行副溶血性弧菌的分离鉴定。对检出的副溶血性弧菌进行毒力基因(*tlh*, *tdh*, *trh*)检测、耐药性分析和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分子分型。结果 50份双壳贝类样品中有18份检出副溶血性弧菌(18株),检出率为36.0%;有8份样品携带诺如病毒。分离的副溶血性弧菌17株为*tlh*+*tdh*-*trh*-型,1株为*tlh*-*tdh*-*trh*-型;所有副溶血性弧菌均对氨苄西林耐药,对其他抗生素均敏感;PFGE图谱聚类后呈现多态性,存在多个克隆群。诺如病毒只在10月份检出,分布于牡蛎、蛏子和扇贝中,均为G II型核酸阳性。结论 顺义区市售双壳贝类中存在副溶血性弧菌和G II型诺如病毒,需警惕感染风险。分离的副溶血性弧菌呈现多态性,但毒力基因携带率较低,对大多数抗生素敏感。

关键词:副溶血性弧菌;诺如病毒;贝类;毒力基因;脉冲场凝胶电泳;耐药性;分型;检出率;顺义

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2018)04-0420-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.04.017

Study on drug resistance and typing of *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* in bivalve shellfish sold in Shunyi District

WANG Yuan-yuan, LI Ying, YANG Jie, WANG Miao

(Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China)

Abstract: Objective To study the pollution condition of *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* in some of bivalve mollusks sold in the market in Shunyi District and provide evidence for the prevention and treatment of infectious diarrhea.

Methods The bivalve molluscs in the market of Shunyi District were collected from July to October of 2017. The appropriate samples were taken to separate the digestive glands, and virus RNA was extracted and real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect *Noroviruses*. The *Vibrio parahaemolyticus* was examined in the remaining samples following the national food safety standard GB 4789.7-2013. The genetic testing of virulence gene, drug resistance analysis and pulse field gel electrophoresis (PFGE) test were carried out on the isolated *Vibrio parahaemolyticus*. **Results** A total of 18 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were detected among 50 samples of shellfish with the positive rate of 36.0%. Eight samples contained *Norovirus*. The virulence genotype of one isolate was *tlh*-*tdh*-*trh*- and the others were *tlh*+*tdh*-*trh*-. All isolates were resistant to ampicillin and sensitive to some other antibiotics. The PFGE patterns of different strains were polymorphic and belong to different clones. *Norovirus* was detected only in October and distributed in oysters, scorpions, and scallops, which are G II-type nucleic acid positive.

Conclusion The *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* of G II were present in commercially available bivalve molluscs in Shunyi District. The isolated *Vibrio parahaemolyticus* was polymorphic, but the virulence genes had a low rate and were sensitive to most antibiotics.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; *Norovirus*; shellfish; virulence gene; pulse field gel electrophoresis; drug resistance; typing; detection rate; Shunyi

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和诺如病毒(*Norovirus*)是引起腹泻常见的病原体,分别在细菌性腹泻和病毒性腹泻中占重要比例^[1-2]。诺如病毒属于杯状病毒科、诺瓦克病毒属,感染人类的主要为G I和G II型,特点是人类普遍易感、感染性强,低剂量(≥ 18 个病毒颗粒)即可引发感染^[3],常见于急性胃肠炎暴发疫情,北京市顺义区近年来也时有报道^[4-5]。副溶血性弧菌的特点是具有嗜盐性,经常在海产品中检出,食用海鲜成为副溶血性弧菌感染的可能来源^[6-7]。另外,贝类是滤食动物,消化腺有富集细菌病毒的特性,且消化组织具有类似于诺如病毒受体的物质,是引发食源性腹泻的高危食品^[8-10]。本研究为了解顺义区市场海鲜食品中副溶血性弧菌和诺如病毒的污染状况,采集市售双壳贝类为代表,同时检测其中的副溶血性弧菌和诺如病毒,并对阳性菌株进行分子特征分析,为感染性腹泻疾病防控提供相关依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

所有检测的样品均采自顺义区的农贸市场、超市等不同场所;采样时间为2017年7~10月,每月上下旬各一次,每次采样6份,最后一次采样8份,共50份。采样种类包括蛏子、牡蛎、扇贝、花蛤、文蛤等双壳贝类。样品采集后当日送至实验室并立即进行检测。

1.1.2 主要仪器与试剂

Light cycler® 480 II 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(德国罗氏),VITEK-2 细菌全自动鉴定仪(法国梅里埃),CHEF III 脉冲场凝胶电泳(PFGE)仪,Gel-DOCXR 凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad。

革兰阴性鉴定卡、阴性细菌药敏卡均购自法国梅里埃,Xba I 和 Sfi I 内切酶(美国 New England),蛋白酶 K(德国 Merck),副溶血性弧菌毒力基因多重 PCR 检测试剂盒(北京卓成惠生生物科技有限公司),3% 氯化钠碱性蛋白胨水(北京君立康科技发展有限公司),科玛嘉显色培养基(上海欣中生物有限公司),RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen),诺如病毒 G I/G II 检测试剂盒(江苏硕世生物科技股份有限公司),大肠埃希菌噬菌体 MS2 过程控制试剂盒(北京良润生物科技有限公司)。所有试剂均在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理及核酸提取

将贝类样品进行解剖,尽量去除外膜及消化腺周围的脂肪组织,称取消化腺 4.0 g 研磨均质,用于诺如病毒检测。本研究以 MS2 作为过程控制病毒,以检测、计算 MS2 的回收率得到诺如病毒的提取效率。均质后的样品平均分为 2 份,一份加 10 μ l MS2 (A 液),另一份不加 MS2 (B 液),样品分别加 2 ml 磷酸盐缓冲液和 10 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml),37 $^{\circ}$ C 振荡消化 60 min,60 $^{\circ}$ C 水浴 15 min 灭活蛋白酶 K,8 000 r/min 离心 5 min,取上清于离心管中,记录液体体积,提取 RNA。

1.2.2 MS2 病毒质控及诺如病毒 PCR 检测

取 20 μ l MS2 病毒,95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 冷却,作为原液,然后用无核糖核酸酶(RNase)的水进行倍比稀释,形成 1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 梯度系列的核酸溶液,作为 MS2 标准品模板。根据 MS2 试剂盒要求配置体系,模板分为 3 类:5 μ l A 液、5 μ l B 液 + 1 μ l MS2、5 μ l 水 + 1 μ l MS2,空白对照为无 RNase 超纯水,阴性对照为试剂盒提供,根据 MS2 过程控制试剂盒设置参数进行实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)。以 MS2 病毒 RNA 浓度的 lg 值为 x 轴,以其循环阈值(Ct 值)为 y 轴建立标准曲线,每一批次试验都需进行 MS2 标准曲线测定。根据样品中 MS2 病毒实时荧光定量 RT-PCR 的 Ct 值和试剂盒给出的公式计算提取效率和扩增抑制指数,样品中 MS2 提取效率 $\geq 1\%$ 则判定此次富集、提取过程有效,否则无效,重复试验。抑制指数 < 2 为合格,否则需比较 10 倍稀释样品的抑制指数。

以样品核酸为模板,按照诺如病毒 G I/G II 检测试剂盒的要求配制反应液和设置参数进行实时荧光定量 RT-PCR 检测。

1.2.3 副溶血性弧菌分离鉴定及毒力基因检测

贝类样品参照 GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[11]进行副溶血性弧菌分离检验,VITEK-2 细菌全自动鉴定仪鉴定。

采用热裂解法提取细菌 DNA:单一菌落接种于胰蛋白胨大豆琼脂培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后,挑取一环菌苔于 200 μ l 灭菌水中充分研磨,沸水浴 5 min,10 000 r/min 离心 5 min,上清即为模板。按照毒力基因多重 PCR 检测试剂盒要求对副溶血性弧菌菌株进行 *tlh*、*tdh*、*trh* 基因检测。

1.2.4 副溶血性弧菌药敏试验

用 VITEK-2 细菌鉴定系统对分离出的副溶血性弧菌进行药敏分析,药敏试验结果判断按照说明书要求读取为耐药(resistant)、中介(intermediate)以及敏感(sensitive)。

1.2.5 副溶血性弧菌 PFGE 分子分型

将副溶血性弧菌分离株用 *Sfi* I 酶进行酶切。选用沙门菌标准菌株(H9812,北京市疾病预防控制中心传染病所)作为分子量标记,用 *Xba* I 酶进行酶切。设置电泳条件:片段大小 78 ~ 396 kb;电泳时间 18 ~ 19 h;脉冲时间 10 ~ 35 s。获得电泳图谱用 BioNumerics 对电泳结果进行聚类分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学检验,计数资料比较用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 污染状况

50 份样品中有 18 份检出副溶血性弧菌(18 株),检出率为 36.0%;有 8 份检出诺如病毒,检出率为 16.0%。7 月上旬至 10 月上旬副溶血性弧菌均有检出,7 月下旬至 9 月下旬检出率一直维持在 50.0% (3/6),10 月下旬未检出(见图 1)。7 ~ 9 月未检出诺如病毒,10 月上旬检出 1 份,10 月下旬检出率达到 87.5% (7/8)。2 种病原体主要分布在牡蛎、蛭子、扇贝、花蛤中(见图 2),其中牡蛎、蛭子的副溶血性弧菌检出率分别为 50.0% (6/12)、50.0% (9/18)。各种贝类副溶血性弧菌和诺如病毒的检出率差异均无统计学意义($\chi^2 = 5.152, P > 0.05$; $\chi^2 = 0.981, P > 0.05$)。

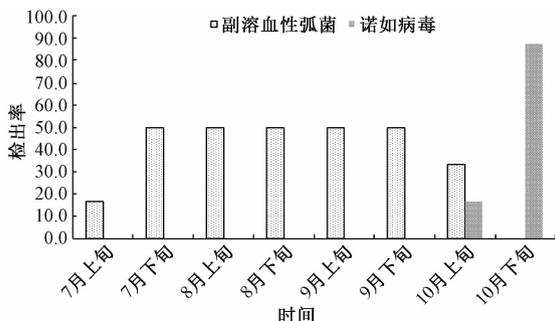


图 1 贝类副溶血性弧菌和诺如病毒检出的时间分布

Figure 1 Time distribution of the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* in shellfish

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 结果

通过 MS2 标准品 Ct 值得到标准曲线方程 $y = -3.919x + 16.62, R^2 = 0.996$ 。根据每份样品中 MS2 的 Ct 值计算该份样品的提取效率及抑制指数,

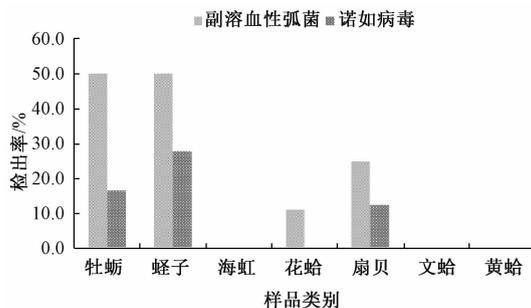


图 2 副溶血性弧菌和诺如病毒在不同样品中的分布情况

Figure 2 Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and *Norovirus* in different categories

均在有限范围内则认定诺如病毒结果可信。实时荧光定量 RT-PCR 结果显示,8 份样品检出的诺如病毒均为 G II 型。

所检出的副溶血性弧菌经毒力基因多重 PCR 鉴定,17 株为 *tlh + tdh-trh*-型,1 株为 *tlh-tdh-trh*-型。

2.3 副溶血性弧菌药敏试验结果

针对氨苄西林、氨苄青霉素/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑林、头孢替坦、头孢他啶、头孢曲松、安曲南、亚胺培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥英、复方新诺明的药敏试验显示,所检出的副溶血性弧菌均只对氨苄西林耐药,且耐药率达 100%,对其他抗生素均敏感。

2.4 副溶血性弧菌 PFGE 结果

18 株副溶血性弧菌菌株经 *Sfi* I 酶切后获得条带图谱,经 BioNumerics 聚类分析,结果显示菌株间的相似值为 12.34% ~ 94.87%,呈多样性,存在多个克隆群,存在相似度高的菌株,但大多数差异较大,见图 3。

3 讨论

2017 年 7 ~ 10 月北京市顺义区市售双壳贝类副溶血性弧菌总检出率为 36.0%,最接近于严寒秋等^[12]报道的北京市市售牡蛎中副溶血性弧菌检出率(33.7%),北京市^[13]、天津市^[14]、山东省^[15]类似研究中海产品的副溶血性弧菌检出率达 16.7% ~ 59.46%。检出率有差别一方面可能由于顺义区的贝类产品大多来自全国各地,来源地复杂,运输储存过程也不尽相同,地域相关性无法突显;另一方面与采样品种有关,贝类为滤食性动物,容易富集细菌病毒,比其他海产品更容易检出副溶血性弧菌。从本研究可看出牡蛎、蛭子的副溶血性弧菌检出率稍高于其他种类。另外,贝类中副溶血性弧菌的检出存在季节性,本研究中夏季副溶血性弧菌检出率较高,进入 10 月份天气变冷,检出率出现骤降,

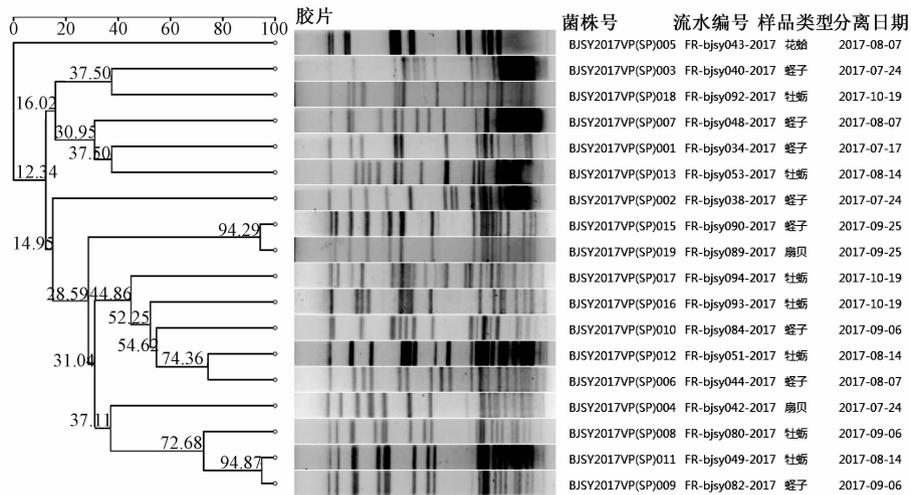


图3 副溶血性弧菌 PFGE 的聚类结果

Figure 3 Cluster results of *Vibrio parahaemolyticus* PFGE

可能因为5~9月海水温度高,利于副溶血性弧菌繁殖,这与腹泻病例中副溶血性弧菌夏秋季检出率高^[16]存在联系。

文献^[17-18]报道牡蛎携带诺如病毒呈明显的季节分布,以冬春季检出率高,随着水温降低,检出率升高。这可能影响人群诺如病毒流行规律。北京市肠道门诊腹泻患者诺如病毒10月开始出现检出高峰^[19],这与本研究中10月下旬诺如病毒检出率较高的结果一致。倪云龙等^[20]报道不同种类双壳贝类诺如病毒感染率有差异,以牡蛎中阳性率最高,而本研究中牡蛎、蛭子、扇贝均检出诺如病毒,并无种类差异,可能由于样品数量少、采样种类随机,缺乏代表性。国内文献^[21-23]较多报道牡蛎中检出诺如病毒,本研究提示蛭子、扇贝可能也是高危食品,因此居民在食用此类海产品时还应注意烹调方式,避免交叉污染,警惕诺如病毒感染。

副溶血性弧菌的耐热直接溶血素(TDH)、耐热直接相关溶血素(TRH)被认为是引起胃肠炎的主要因子。不耐热溶血素(TLH)的基因具有高度保守性,并与溶藻弧菌中的 tlh 基因具有较高相似性,但鉴定致病相关的证据不足^[24]。本研究中大多数菌株检出 tlh 基因,未检出 tdh 、 trh 基因,所以不携带毒力基因,为非致病菌株,这与全国水产品副溶血性弧菌毒力基因检出情况基本类似^[25]。北京市引起腹泻的副溶血性弧菌中优势基因型为 $tlh + tdh + trh$ ^[26],当贝类被副溶血性弧菌产毒菌株污染时才引起腹泻暴发与流行。食品中检出副溶血性弧菌并不代表致病,所以日常检测中更应考虑毒力因子的进一步检测。

本研究中副溶血性弧菌的PFGE图谱差异较大,亲缘关系有的相对较远,类型多样,存在多个克

隆群。环境中副溶血性弧菌复杂多样且随时发生变异,遗传信息量巨大,同一份样品也可检出多个菌株型,且PFGE图谱不同^[27-28],所以对环境中副溶血性弧菌的PFGE分型只有与临床腹泻患者分离菌株关联研究才更有意义。

本研究中贝类分离的副溶血性弧菌菌株,对氨苄西林的耐药性达100%。国内外副溶血性弧菌耐药相关报道^[29-30]中均提到对氨苄西林高度耐药,考虑贝类大多是滩涂养殖,抗生素使用较少,有可能是近海海底环境受到污染。国家应规范抗生素在养殖业中的使用,避免生物富集,严格监督临床抗生素使用。

参考文献

- [1] 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病发病率[J].中华疾病控制杂志,2013,17(3):265-267.
- [2] 邵占涛,王园园,李颖,等.2013—2014年北京市顺义区感染性腹泻病原菌监测分析[J].实用预防医学,2015,22(10):1244-1246.
- [3] TEUNIS P F, MOE C L, LIU P B, et al. Norwalk virus: how infectious is it? [J]. J Med Virol, 2008, 80(8):1468-1476.
- [4] 张静,常昭瑞,孙军玲,等.我国诺如病毒感染性腹泻流行现状及防控措施建议[J].疾病监测,2014,29(7):516-521.
- [5] 王园园,张爽.北京市顺义区轮状病毒与诺如病毒腹泻病原特征分析[J].国际病毒学杂志,2015,22(4):274-276.
- [6] HUEHN S, EICHHORN C, URMERSBACH S, et al. Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany[J]. Int J Med Microbiol, 2014, 304(7):843-850.
- [7] RASZL S M, FROELICH B A, VIEIRA C R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in South America: water, seafood and human infections[J]. J Appl Microbiol, 2016, 121(5):1201-1222.
- [8] TIAN P, BATES A H, JENSEN H M, et al. *Norovirus* binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells[J].

- Lett Appl Microbiol, 2006, 43(6):645-651.
- [9] 周德庆, 苏来金, 赵峰, 等. 诺如病毒在贝类中的富集特性与机制研究进展[J]. 病毒学报, 2015, 31(3):313-317.
- [10] 骆海朋, 高飞, 于海瑶, 等. 北京市市售贝类、蔬菜、浆果、即食海产品中诺如病毒污染状况检测及检测方法探析[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(2):218-222.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验: GB 4789.7—2013 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [12] 严寒秋, 曲梅, 高志勇, 等. 北京市市售带壳牡蛎致病性弧菌污染状况调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(6):646-649.
- [13] 吴青, 韩海红, 余东敏, 等. 北京市水产品污染与感染病例中副溶血性弧菌血清型和毒力基因型的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(4):363-367.
- [14] 张致一, 刘军, 董杰, 等. 天津市市售贝类水产品中副溶血性弧菌污染和耐药状况的调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(14):2413-2415.
- [15] 王克波, 赵金山, 刘丹茹, 等. 山东省1090份市售水产品中食源性致病菌污染状况分析[J]. 现代预防医学, 2017, 44(22):4069-4072.
- [16] 徐秋芳, 施怡茹, 卢晓芸, 等. 基于腹泻多病原监测研究副溶血性弧菌的感染状况和疾病负担[J]. 疾病监测, 2017, 32(10/11):814-817.
- [17] 吕素玲, 李秀桂, 姚雪婷, 等. 2014年广西北海市养殖环境与牡蛎中诺如病毒污染相关性调查[J]. 实用预防医学, 2017, 24(7):769-772.
- [18] 梁辉, 蒋琦, 戴光伟, 等. 2011—2012年广东省市售牡蛎中诺如病毒污染调查分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(4):359-362.
- [19] 张惺惺, 高志勇, 刘白薇, 等. 北京市2011—2016年肠道门诊腹泻患者中诺如病毒检出率的时间分布特征分析[J]. 中国病毒病杂志, 2017, 7(3):218-222.
- [20] 倪云龙, 郑东宇, 江涛, 等. 2015—2016年江苏地区双壳贝类海产品中诺如病毒携带状况[J]. 江苏预防医学, 2017, 28(4):395-397, 402.
- [21] 柯明月, 王坤明, 陈佳璐, 等. 2014年厦门地区市售牡蛎诺如病毒污染状况调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(10):1634-1637.
- [22] 李平, 黄涵, 余倩, 等. 海口市市售牡蛎中诺如病毒的分子检测[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(5):447-449, 455.
- [23] 江涛, 韩春卉, 张宏元, 等. 北京市市售牡蛎中诺如病毒核酸检测及定量分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(2):126-130.
- [24] 张德福, 付绪磊, 张明, 等. 副溶血性弧菌毒力因子及致病机理的研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(7):216-222.
- [25] 白瑶, 叶淑瑶, 闫韶飞, 等. 2015年我国食源性副溶血性弧菌毒力基因及耐药特征研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6):2318-2324.
- [26] 严寒秋, 张新, 黄瑛, 等. 2011—2014年北京市副溶血性弧菌血清型及毒力基因特征分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(24):4468-4470.
- [27] 陈洪友, 图丽红, 陈敏, 等. 贝类水产品中副溶血性弧菌菌型分布研究[J]. 疾病监测, 2014, 29(7):522-527.
- [28] 唐玉香. 天津市滨海新区汉沽市售麻蚶中副溶血性弧菌的分离与分子特征[J]. 职业与健康, 2017, 33(15):2051-2054.
- [29] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review [J]. Food Microbiol, 2016, 57(2):128-134.
- [30] 韩海红, 李凤琴, 徐进, 等. 2013年中国三省贝类及环境中副溶血性弧菌分离株耐药特征分析[J]. 卫生研究, 2015, 44(3):382-386.

· 公告 ·

市场监管总局关于发布《食品中那非类物质的测定》 食品补充检验方法的公告

[2018年第14号]

按照《食品补充检验方法工作规定》有关规定,《食品中那非类物质的测定》食品补充检验方法已经国家市场监督管理总局批准,现予发布。

特此公告。

附件:食品中那非类物质的测定(BJS 201805)

市场监管总局

二〇一八年七月二日

(相关链接: http://samr.saic.gov.cn/gg/201807/t20180704_274876.html)