

研究报告

辽宁省海鱼异尖线虫感染调查及分子鉴定

耿英芝,李飞,王伟杰,张眉眉

(辽宁省疾病预防控制中心,辽宁 沈阳 110005)

摘要:目的 了解辽宁省市售海洋鱼类异尖线虫感染情况,并对异尖线虫Ⅲ期幼虫进行分子鉴定,确定感染异尖线虫虫种。方法 采用直接剖检法从市售海鱼中检出异尖线虫Ⅲ期幼虫后,在显微镜下观察形态进行初步鉴定;提取异尖线虫虫体总DNA,采用通用引物扩增异尖线虫核糖体DNA内转录间隔区(ITS)序列,并对其ITS1和ITS2序列进行序列比对和进化分析。结果 采集222份市售海鱼样品进行剖检,共有70份检出异尖线虫幼虫,检出率为31.53%,其中小黄花鱼和带鱼的检出率较高,感染度最高为233条/份。测序结果经序列比对和进化分析,结果显示检出的异尖线虫幼虫分别为异尖线虫属和宫脂线虫属的5种异尖线虫,包括简单异尖线虫(*Anisakis simplex*)、派氏异尖线虫(*Anisakis pegreffii*)、典型异尖线虫(*Anisakis typical*)、内弯宫脂线虫(*Hysterothylacium aduncum*)和厦门宫脂线虫(*Hysterothylacium amoyense*)。结论 辽宁省市售海洋鱼类异尖线虫感染情况较严重,且感染的异尖线虫种类多样,其感染优势种为派氏异尖线虫。

关键词:异尖线虫;分子鉴定;鱼;寄生虫;辽宁

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2019)01-0010-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.01.003

Molecular identification and investigation on the infection of *Anisakis* from marine fishes in Liaoning Province

GENG Yingzhi, LI Fei, WANG Weijie, ZHANG Meimei

(Liaoning Center for Disease Prevention and Control, Liaoning Shenyang 110005, China)

Abstract: Objective To investigate the infection in marine fishes from the local markets in Liaoning Province and identify the third larvae of *Anisakis* by molecular biological method. **Methods** The microscopically morphologies were performed after the larvae of *Anisakis* were detected by direct dissection. The rDNA internal transcribed space (ITS) sequences of *Anisakis* were extracted and amplified, and the sequences of ITS1 and ITS2 in the ribosome gene spacer were compared and analyzed. **Results** The larvae of *Anisakis* was detected from 70 fishes, the infection rate was 31.53% (70/222). *Larimichthys polyactis* and *Trichiurus haumel* had higher infection rates, and the highest degree of infection was 233 larvae per fish. The larvae were divided into different genus by sequence alignment and evolutionary analysis. Five *Anisakis* nematodes including *Anisakis simplex*, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis typical*, *Hysterothylacium aduncum* and *Hysterothylacium amoyense* were identified. **Conclusion** The infection situation of marine fish was quite serious in Liaoning Province, and the dominant species of infection was *Anisakis pegreffii*.

Key words: *Anisakis*; morphological identification; fish; parasite; Liaoning

异尖线虫主要寄生于海鱼、海洋哺乳动物、海鸟等宿主体内,呈世界性分布,被我国列为禁止入境的二类动物寄生虫。异尖线虫病(anisakiasis)是指人误食寄生在海鱼等体内的异尖线虫活的Ⅲ期幼虫而引起的疾病,可引起人的过敏反应、急腹症症状等^[1-2],是一种重要的食源

性人兽共患寄生虫病。据报道^[3]全球感染异尖线虫病病例达3万余例,且以每年2000多例的速度递增,而在我国海洋鱼类感染异尖线虫的报道很多,但仅QIN等^[4]报告了1例人感染病例。随着人们饮食习惯的改变,生食或半生食海鲜的人群逐渐增多,患异尖线虫病的几率大大增加,应引起高度重视。为了解辽宁省市售海洋鱼类异尖线虫感染情况,本研究对异尖线虫感染情况进行了初步调查,并对检获的异尖线虫Ⅲ期幼虫进行分子鉴定。

收稿日期:2018-11-13

作者简介:耿英芝 女 副主任技师 研究方向为微生物检测

E-mail:genggeng911@aliyun.com

通信作者:张眉眉 女 主任技师 研究方向为微生物检测

E-mail:zangmeimei@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2016—2017年从辽宁省采集的市售鲜、活海洋鱼类,包括小黄花鱼、带鱼、鲅鱼、青鱼、大黄鱼、油寇鱼、大头宝鱼、红娘子、鲈鱼、辫子鱼、鳌鱼和梭鱼,共222份。样品主要产自辽宁省(81.98%,182/222),浙江省占2.70%(6/222),山东省占2.25%(5/222),另有13.06%(29/222)的样品产地不详。

1.1.2 主要仪器与试剂

聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI),电泳仪和全自动凝胶成像分析系统均购自美国伯乐,光学显微镜。

动物基因组DNA提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司),Premix Ex Taq(大连宝生物工程有限公司),100 bpDNA ladder(北京全式金生物技术有限公司),pGEM-T载体和胶回收试剂盒(上海天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 异尖线虫分离和形态学鉴定

将采集的鱼类直接剖检,主要在鱼的内脏、体腔等部位寻找异尖线虫Ⅲ期幼虫,将检获的异尖线虫进行分类、编号,并用生理盐水冲洗,经光学显微镜初步鉴定为异尖线虫Ⅲ期幼虫后,于70%乙醇中保存备用。

1.2.2 DNA提取及PCR扩增

样品总DNA提取:挑取70%乙醇保存的单条虫体,蒸馏水反复冲洗3遍,用研磨棒将虫体研碎,DNA提取按动物基因组DNA提取试剂盒说明书操作。

PCR扩增:以提取后的总DNA作为模板,用通用引物NC5(5'-TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3')和NC2(5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3')扩增异尖线虫内转录间隔区(ITS)序列,目的片段大小约为1000 bp。反应体系(25 μl): Premix Ex Taq 12.5 μl,引物NC5和NC2(10 pmol/L)各1 μl,DNA模板3 μl,加焦碳酸二乙酯(DEPC)水至25 μl,混匀后置PCR扩增仪中扩增。扩增条件:94℃预变性5 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸75 s,30个循环;72℃延伸7 min,置4℃可短期保存。取7 μl扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分析,稳压120 V,约40 min,在凝胶成像仪中观测结果。

1.2.3 胶回收和克隆测序

PCR扩增产物电泳后,切阳性胶回收目的条带,并按试剂盒操作说明与pGM-T载体连接,然后

转化到DH5a感受态细胞。挑选阳性单个菌落培养,经PCR验证后送至英潍捷基有限公司进行测序。

1.2.4 序列比对与进化分析

测序序列后,使用美国生物技术信息中心(NCBI)数据库中BLAST在线工具(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行在线比对,进一步确定异尖线虫的各个种。将测序结果与GenBank下载的相应ITS序列采用Clustal X软件进行差异性分析,调整后运用邻接法用MEGA5软件构建系统进化树。

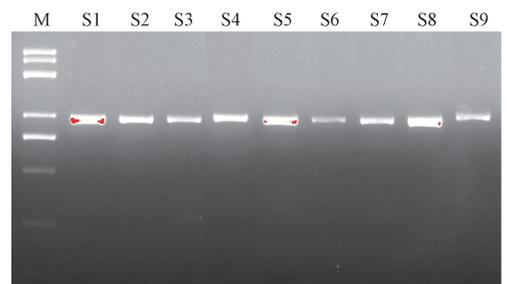
2 结果

2.1 感染情况

本次研究对2016—2017年辽宁省222份市售海鱼进行剖检,其中70份检出异尖线虫Ⅲ期幼虫,检出率为31.53%,其中1份鲜带鱼中发现233条异尖线虫。从季节看,第三季度的检出率最高(50.83%,61/120),其次是第二季度和第四季度。从异尖线虫Ⅲ期幼虫的检出部位看,主要寄生在海鱼肠系膜及肠壁、体腔和胃壁等。

2.2 ITS序列PCR扩增结果

选取不同海鱼异尖线虫总基因组DNA为模板,用ITS通用引物NC5和NC2进行PCR扩增,产物用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳分析。不同海鱼感染的异尖线虫Ⅲ期幼虫均能扩增出大小为1000 bp左右的片段,片段的大小与预期片段大小一致,电泳结果见图1。



注:M为Trans 2 K DNA Mark;S1~S9分别为小黄花鱼、带鱼、青鱼、红娘子、鲅鱼、大黄鱼、鳌鱼、辫子鱼、油寇鱼感染的异尖线虫Ⅲ期幼虫

图1 异尖线虫幼虫通用引物扩增结果

Figure 1 PCR products amplified by universal primers of *Anisakidae* larvae

2.3 序列比对分析

经与BLAST在线比对,本研究共得到5种异尖线虫基因序列结果,其中S4、S11、S13与GenBank中已知的简单异尖线虫(*Anisakis simplex*,登录号为KM273043)同源性为99%;S6、S7与典型异尖线虫(*Anisakis typical*,登录号为KC928262)同源性为

99%；S1、S3、S5、S8、S9 和 S12 与派氏异尖线虫 (*Anisakis pegreffii*, 登录号为 KF923926) 同源性为 99%；S2 与内弯宫脂线虫 (*Hysterothylacium aduncum*, 登录号为 HQ702733) 同源性为 99%；S10 与厦门宫脂线虫 (*Hysterothylacium amoyense*, 登录号为 KP252133) 同源性为 99%。

2.4 构建系统进化树

选取 13 份样品的 IST 序列与 GenBank 下载的相应基因序列用 Clustal X 进行多重比对后,调整后用 MEGA5 软件采用 M-L 法构建系统进化树,从系统进化树(图 2)可以发现,异尖线虫属和宫脂线虫属分别构成一个独立的拓扑结构,其中 S4、S11、S13 与简单异尖线虫构成自展值为 93% 的分支, S1、S3、S5、S8、S9、S12 与派氏异尖线虫构成自展值为 99% 的分支,简单异尖线虫与派氏异尖线虫汇成一个独立的分支; S6、S7 与典型异尖线虫构成自展值为 99% 的独立分支,以上两个独立分支汇成异尖线虫属的拓扑结构分支。S2 与内弯宫脂线虫构成自展值为 99% 的独立分支, S10 与厦门宫脂线虫构成自展值为 99% 的独立分支,以上两个分支汇成宫脂线虫属的拓扑结构分支。

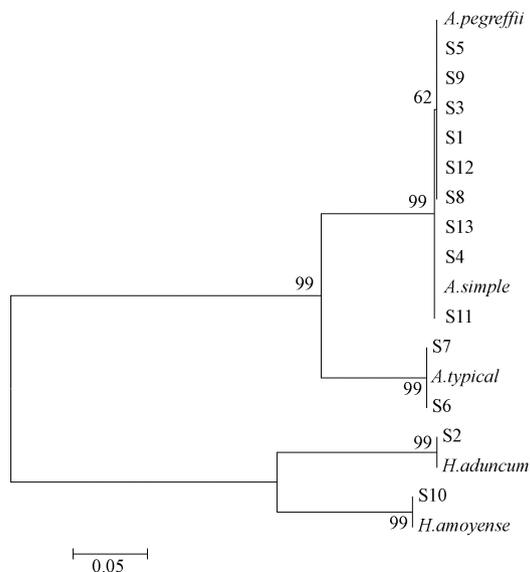


图 2 ITS 序列构建的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed by the ITS sequence

3 讨论

3.1 感染情况

通过本次调查发现辽宁省市售的海洋鱼类异尖线虫的感染比较严重,不同品种海鱼的感染率也各不相同,其中小黄鱼和带鱼的异尖线虫感染率较高。同时在鳌鱼、辫子鱼、油寇鱼体内发现了异尖线虫的存在。感染强度最高的是在 1 份鲜带鱼样品体内检出 233 条异尖线虫。我国海洋鱼类感染异尖

线虫的报道很多,但目前异尖线虫感染病例的报道仅有 1 例,可能与我国生食海鱼人群不多或诊断中存在误诊和漏诊有关,应该密切关注可以生食海洋鱼类异尖线虫感染情况,同时加强有生食海鲜等习惯的高危人群异尖线虫感染的监测。

3.2 序列比对

经序列比对分析,本次辽宁省市售海洋鱼类异尖线虫流行病学调查发现 2 个属(异尖线虫属和宫脂线虫属)共 5 种异尖线虫,还发现了厦门宫脂线虫,同时确定了派氏异尖线虫为辽宁省市售海洋鱼类异尖线虫感染的优势物种。异尖线虫的分布具有一定的地区特殊性,本次调查结果与杜春霞^[5]黄海鱼类寄生异尖线虫幼虫及内弯宫脂线虫的分子鉴定研究结果比较一致,发现了内弯宫脂线虫,黄海海洋鱼类感染的异尖线虫主要是派氏异尖线虫,为黄海的优势物种。之前认为厦门宫脂线虫只在我国台湾海峡流行^[6],而本次调查在带鱼中检出了厦门宫脂线虫,这与周晶耀等^[7]关于舟山渔场海洋鱼类异尖线虫感染调查及分子鉴定报道较一致,都说明了厦门宫脂线虫在中国的其他海域也广泛存在。而且本次调查中还发现了简单异尖线虫和典型异尖线虫,均是引起异尖线虫病的主要病原。

3.3 系统进化树

通过选取有代表性的 IST 序列与 GenBank 中对应的基因序列构建系统进化树,可以发现异尖线虫属和宫脂线虫属分别构成一个独立的拓扑结构。其中异尖线虫属拓扑结构包括两个独立的分支,一个分支为典型异尖线虫,另一个分支为简单异尖线虫与派氏异尖线虫;宫脂线虫属拓扑结构也包括两个独立的分支,分别是内弯宫脂线虫和厦门宫脂线虫。

尽管烹饪和冷冻可以使异尖线虫的虫体死亡,但此方法不能破坏虫体携带的过敏蛋白^[8-9],可能引起广泛的过敏反应,需要消费者提高警惕。而且,近年来随着人们饮食习惯的改变,喜食生鱼的人群越来越多,人感染异尖线虫病的风险也相应增加,因此,加强易感鱼种异尖线虫感染情况的监测,针对临床医生进行食源性寄生虫病认知培训,开展人群健康教育,对减少异尖线虫病的发生意义重大。

参考文献

- [1] FURUKAWA K, YOSHIDA K, NOJIRI T, et al. Adult intussusception caused by Meckel's diverticulum complicated by anisakiasis of the small intestine; report of a case [J]. Clinical Journal of Gastroenterology, 2014, 7(4): 316-319.
- [2] LIM H, JUNG B, CHO J, et al. Molecular diagnosis of cause of

- anisakiasis in Humans, South Korea [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(2):342-344.
- [3] ARIZONO N, YAMADA M, TEGOSHI T, et al. *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis [J]. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2012, 9(6):517-521.
- [4] QIN Y H, ZHAO Y F, REN Y X, et al. Anisakiasis in China: the first clinical case report [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013, 10(5):472-474.
- [5] 杜春霞. 黄海鱼类寄生异尖属线虫幼虫及内弯宫脂线虫的分子鉴定[D]. 石家庄:河北师范大学, 2008.
- [6] FANG W Z, XU S S, ZHANG S L, et al. Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan Strait [J]. *Exp Parasitol*, 2010, 124(2):197-201.
- [7] 周晶耀, 林启, 张辉, 等. 舟山渔场海洋鱼类异尖线虫感染调查及分子鉴定[J]. *预防医学*, 2017, 29(7):694-697.
- [8] PEKMEZCI G Z. Occurrence of *Anisakis simplex sensu stricto* in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185(5):64-68.
- [9] 黄燕琼, 张森, 何淑华, 等. 广州白云机场口岸入境海鱼感染异尖线虫鉴定研究[J]. *广东农业科学*, 2017, 44(4):146-151.

研究报告

北京市顺义区 87 名健康人中产气荚膜梭菌携带特征研究

李红新¹, 卢迎瑞², 张爽³, 蔡建国¹, 马红梅³, 李印东³, 李颖³

(1.北京市顺义区旺泉社区卫生服务中心, 北京 101300; 2.吉林大学公共卫生学院, 吉林 长春 130021; 3.北京市顺义区疾病预防控制中心, 北京 101300)

摘要:目的 调查北京市顺义区健康人群携带产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, Cp)的生物特征, 研究分离菌株携带产气荚膜梭菌肠毒素(*Clostridium perfringens enterotoxin*, Cpe)、 $\beta 2$ 毒力基因情况以及 Cp 在人群中的分布特征, 为 Cp 导致食源性疾病的判定提供健康对照组数据。方法 对采集的 87 份健康体检者粪便开展 Cp 分离培养、平板计数和菌株 *cpe*、 $\beta 2$ 毒力基因的聚合酶链式反应(PCR)检测, 对检测结果进行统计分析。结果 87 名健康人粪便中血平板分离培养后 Cp 检出率为 64.37% (56/87); Cp 的月份、性别、年龄分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。共有 57 份粪便标本平板计数结果大于最低检出限 (10 CFU/g), 最高定量值为 4.12×10^6 CFU/g, 均值为 1.70×10^5 CFU/g, 中位数为 5.30×10^3 CFU/g, 95% 分位数为 7.00×10^5 CFU/g。分离的 56 株 Cp 中, *cpe* 毒力基因检出率为 0.00% (0/56), $\beta 2$ 毒力基因检出率为 73.21% (41/56)。结论 87 名健康人粪便中 Cp 检出率较高, 且 $\beta 2$ 毒力基因携带率较高, Cp 引起食源性疾病的原因需要更深度生物标志识别或定量数据分析进行研究。

关键词:产气荚膜梭菌; 毒素; 食源性疾病; 人畜共患病原菌; 食源性致病菌

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2019)01-0013-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.01.004

Characteristic of *Clostridium perfringens* isolated from 87 healthy people in Shunyi District, Beijing

LI Hongxin¹, LU Yingrui², ZHANG Shuang³, CAI Jianguo¹, MA Hongmei³, LI Yindong³, LI Ying³

(1. Wangquan Community Health Service Center in Shunyi District, Beijing 101300, China;
2. Public Health School of Jilin University, Jilin Changchun 130021, China;
3. Beijing Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of *Clostridium perfringens* (Cp) from 87 healthy people in Shunyi District of Beijing. To study the prevalence of *cpe* and the $\beta 2$ toxin gene in the bacterial strain and the distribution characteristics of Cp. It will provide a baseline for the determination of foodborne diseases caused by Cp. **Methods** The stool of 87 health people were collected for Cp isolation culture, plate count and *cpe* and $\beta 2$ genes test. Statistical analysis

收稿日期: 2018-11-14

作者简介: 李红新 女 副主任医师 研究方向为临床医学 E-mail: war36@163.com

通信作者: 李颖 男 主管检验师 研究方向为病原微生物 E-mail: liying19830805@126.com