

2014-2016 年厦门市思明区海产品中副溶血性弧菌动态监测

王坤明, 高亚色, 林英华, 柯明月

厦门市思明区疾病预防控制中心, 福建 厦门 361000

摘要: **目的** 掌握厦门市思明区 2014-2016 年 5-10 月份市售海产品中副溶血性弧菌的污染状况以及分离菌株的血清型、耐药性与毒力基因携带状况, 为食品安全监管、食源性疾病防控提供参考。 **方法** 2014-2016 年 5-10 月份自思明区农贸市场与超市采集海产品样品分离副溶血弧菌, 对分离菌株进行血清学分群、药物敏感试验以及毒力基因 *tdh* 和 *trh* 检测。 **结果** 180 份样品共检出副溶血性弧菌菌株 146 株, 检出率为 81.11%, 各类海产品检出率差异无统计学意义; 7-9 月份检出率均较 5 月份高。分离菌株血清群分布广泛, 呈多样化状况, 且以 O2(27.27%)、O1(22.60%)、O4(15.75%)、O3(10.96%) 为主。所有分离株均对氨苄西林耐药, 对头孢曲松等 16 种抗生素敏感。仅检出一株菌株携带 *tdh* 毒力基因, 毒力基因检出率为 0.68%。 **结论** 2014-2016 年厦门市思明区 5-10 月份海产品存在严重的副溶血性弧菌污染; 分离株血清型以 O2、O1、O4、O3 为主, 呈多样性; 毒力基因携带率不高; 分离株均对大部分抗菌药物敏感。

关键词: 副溶血性弧菌; 海产品; 血清型; 耐药性; 毒力基因

中图分类号: R155.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)02-0228-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.02.032

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, Vp) 可从各类海产品如鱼类、贝类、头足类等中检出。生吃或误食含有 Vp 的海产品, 容易导致急性肠胃炎, 出现腹泻、头痛、呕吐、恶心、腹部绞痛和低热等症状。

据国内文献报道, 自 1998 年以来, 我国引起微生物性食物中毒的病原发生了显著的变化, 副溶血性弧菌引起的食物中毒已高居微生物性食物中毒的首位,

作者简介: 王坤明 (1983-), 男, 学士, 主管技师, 主要从事微生物检验工作。

通信作者: 高亚色, E-mail: hsds23d@163.com。

特别是沿海省份^[1-3]。多年来, 思明区每年发生的食源性疾病仍以细菌性食物中毒为主, 致病因素主要为副溶血性弧菌, 经资料统计, 思明区 2007-2014 年报告细菌性食物中毒 114 起, 其中因副溶血性弧菌引起的有 44 起, 占 38.6%^[4]。鉴于副溶血性弧菌引起的食源性疾病风险较高, 本研究致力于该项目的研究, 旨在通过对思明区海产品污染状况进行动态监测, 从而了解辖区海产品副溶血性弧菌污染情况, 掌握本辖区海产品副溶血性弧菌流行的血清型及分离株的耐药状况、毒力基因携带状况。

3 种金属均有样品处于轻度污染水平, 如不及时控制, 随着生物富集效应和水体环境的不断恶化, 这种污染水平可能会逐步加重, 需要引起足够的重视。

本次调查发现, 该地海产品中镉含量较高, 海鱼类铬、镉以及甲壳类镉均有超标, 海鱼类对铅、铬及镉的富集能力较强。这 3 类海产品, 在日常消费中占有较大的比重, 因此, 建议有关部门应加强对水体环境的监管。

参考文献

- [1] 张明月, 商博东, 段梦茹, 等. 天津地区水产品重金属污染状况调查[J]. 环境与健康杂志, 2015, 32(6): 538-539.
- [2] 闫双双, 蔡庆涛, 方浩成, 等. 厦门市居民水产品膳食结构的调查与评价[J]. 中国初级卫生保健, 2015, 29(3): 72-75.
- [3] 王茂波, 刘正毅, 李静, 等. 烟台市海域水产品中重金属和砷污染状况调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1): 67-70.

- [4] 刘守廷, 蒋天成, 罗平, 等. 北部湾海产品中重金属元素的测定及评价[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 853-857.
- [5] 白艳艳, 潘秋仁, 贾玉珠. 2015 年厦门市售水产动物及藻类食品中重金属污染状况评价[J]. 实用预防医学, 2017, 24(11): 1314-1317.
- [6] 宋晓响, 李瑞, 张磊, 等. 大连市售海产品铅、镉污染状况分析及评价[J]. 实用预防医学, 2013, 20(12): 1474-1475.
- [7] 樊伟, 王晶, 王若燕, 等. 绍兴市水产品中 6 种重金属调查[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(6): 536-538.
- [8] 荣飏, 洪华荣. 厦门市售水产品中重金属污染分析与评价[J]. 海峡预防医学杂志, 2015, 21(1): 52-54.
- [9] 刘媛媛, 王悦, 於香湘. 洋口港水产品重金属含量状况调查及评价[J]. 环境与可持续发展, 2010, 35(1): 35-37.
- [10] 程国霞, 郭蓉, 王彩霞, 等. 陕西省市售水产品中重金属污染状况及安全评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(22): 3313-3316.

收稿日期: 2018-05-17

1 材料与方 法

1.1 样品 2014-2016年,每年5-10月采集思明区农贸市场、超市海产品60份,3年共采集180份,分离到副溶血弧菌146株,其中鱼类68份、贝壳类72份、头足类23份、甲壳类13份、其他4份。

1.2 培养基与试剂 3%氯化钠碱性蛋白胨水、TCBS琼脂、三糖铁琼脂、氧化酶试剂、副溶血性弧菌生化鉴定管套装均为北京陆桥生物技术有限公司产品;VITEK2 GN鉴定卡、VITEK2 AST-GN13药敏卡为法国生物梅里埃公司产品;14种副溶血性弧菌O抗原诊断血清为天津生物芯片技术有限责任公司产品;副溶血性弧菌(tdh、trh)双重核酸荧光PCR检测试剂盒为深圳生科原生物股份有限公司产品(货号SKY-8114)。均在有效期内使用。

1.3 仪器设备 法国梅里埃生物公司VITEK 2 compact30全自动微生物鉴定及药敏分析仪;美国ABI公司7500型实时荧光定量PCR仪。

1.4 方法

1.4.1 V_p增菌、分离和鉴定 采用国标GB 4789.7-2013进行定性检验^[5]。鱼类和头足类取表面组织、肠和鳃。贝类取全部内容物;甲壳类取整个动物包括肠和鳃。以无菌操作取样品25g,加入3%氯化钠碱性蛋白胨水225ml,用拍击式均质器拍击2min,制备成1:10的样品匀液。将1:10样品匀液置于36℃±1℃培养8~18h。对所有显示生长的增菌液,于TCBS平板上划线分离,于36℃±1℃培养18~24h。对于在TCBS上呈绿色、圆形、半透明、表面光滑的菌落,挑取3个,少于3个全部挑取,划线接种3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板,36℃±1℃培养18~24h进行纯培养。纯培养后进行初步鉴定,转种3%氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层及嗜盐性试验,36℃±1℃培养24h观察结果。确定鉴定:取纯培养物用VITEK2全自动微生物鉴定仪GN鉴定卡进行鉴定。

1.4.2 血清学分型 用含3%氯化钠的5%甘油溶液冲洗3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂斜面培养物,获得浓厚的菌悬液。菌悬液转移到离心管内,121℃灭菌1h。灭菌后4000r/min离心15min,弃去上层液体,沉淀用生理盐水洗三次,每次4000r/min离心15min,最后一次离心后留少许上层液体,混匀制成菌悬液。菌悬液用O群血清进行凝聚,生理盐水作为对照。

1.4.3 药敏试验 按照生物梅里埃VITEK 2 AST-GN13卡说明书进行,用VITEK 2全自动微生物分析仪进行药敏鉴定。

1.4.4 毒力基因tdh、trh检测 按照深圳生科原的试

剂盒说明书进行:取1.5ml离心管加入1ml无菌纯水,刮取V_p阳性株菌苔做成菌悬液,12000rpm离心5min,弃上清保留沉淀,取50μlDNA提取液重悬沉淀,再置金属浴100℃裂解5min,12000rpm离心2min,取上清用ABI 7500实时荧光定量PCR仪扩增检测。结果判断,阳性对照和阴性对照正常,样品ct值小于38,且曲线呈S型,即判为阳性。

1.5 统计学处理 将原始资料整理后,统一录入Excel 2003数据库,应用SPSS 19.0软件对各变量进行统计学描述及分析。率的比较采用 χ^2 检验(采用Bonferroni法进行多重比较),检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 各类海产品中V_p检测情况 2014-2016年共检测样品180份,共检测到副溶血弧菌146株,海产品V_p总检出率为81.11%。根据海产品种类分析,V_p检出率由高到低依次是甲壳类(84.62%)、头足类(82.61%)、鱼类(80.88%)、贝壳类(80.56%)、其他(75.00%)。对5种海产品检出率间进行比较,结果显示检出率差异无统计学意义(Fisher精确检验, $P>0.05$)。见表1。

表1 2014-2016年思明区市售海产品V_p定性检测情况

| 种类 | 数量(份) | 检出数(份) | 检出率(%) |
|-----------------|-------|--------|--------|
| 鱼类 | 68 | 55 | 80.88 |
| 贝壳类 | 72 | 58 | 80.56 |
| 头足类 | 23 | 19 | 82.61 |
| 甲壳类 | 13 | 11 | 84.62 |
| 其他 ^a | 4 | 3 | 75.00 |
| 合计 | 180 | 146 | 81.11 |

注:其他^a:指海参、海蜇、海带。

2.2 不同月份海产品中V_p检测情况 2014-2016年5-10月份,每月V_p检测情况:5月份,检测32份,检出19份,检出率59.38%;6月份,检测28份,检出25份,检出率89.29%;7月份,检测28份,检出24份,检出率85.71%;8月份,检测32份,检出27份,检出率84.38%;9月份,检测25份,检出23份,检出率92.00%;10月份,检测35份,检出28份,检出率80.00%。各月份检出率进行比较,结果差异有统计学意义($\chi^2=13.662, P=0.017$)。5月份与7、8、9月份检出率进行两两比较,差异均有统计学意义(Bonferroni法,均 $P<0.0056, P=0.0018, 0.0043, 0.0049992, 0.0007$);5月份与6、10月份比较,差异无统计学意义(Bonferroni法,均 $P>0.0056, P=0.018, 0.108$);10月份与6、7、8、9月份检出率两两比较,差异无统计学意义(Bonferroni法,均 $P>0.0056$)。见表2。

表2 按月份 V_p 定性检测情况

| 月份 | 数量(份) | 检出数(份) | 检出率(%) |
|----|-------|--------|--------|
| 5 | 32 | 19 | 59.38 |
| 6 | 28 | 25 | 89.29 |
| 7 | 28 | 24 | 85.71 |
| 8 | 32 | 27 | 84.38 |
| 9 | 25 | 23 | 92.00 |
| 10 | 35 | 28 | 80.00 |
| 合计 | 180 | 146 | 81.11 |

2.3 VITEK 2 GN 卡鉴定结果

分离的 146 株副溶血性弧菌菌株,用 VITEK2 全自动微生物鉴定及药敏

表3 不同种类海产品 V_p 分离株 O 抗原群分布情况

| O 抗原 | 鱼类 | | 贝壳类 | | 头足类 | | 甲壳类 | | 其他 | | 合计 | |
|------|----|--------|-----|--------|-----|--------|-----|--------|----|--------|-----|--------|
| | 数量 | 构成比(%) | 数量 | 构成比(%) | 数量 | 构成比(%) | 数量 | 构成比(%) | 数量 | 构成比(%) | 数量 | 构成比(%) |
| O1 | 9 | 16.36 | 18 | 31.03 | 5 | 26.32 | 1 | 9.09 | 0 | 0.00 | 33 | 22.60 |
| O2 | 15 | 27.27 | 15 | 25.86 | 7 | 36.84 | 3 | 27.27 | 0 | 0.00 | 40 | 27.40 |
| O3 | 8 | 14.55 | 6 | 10.34 | 0 | 0.00 | 1 | 9.09 | 1 | 33.33 | 16 | 10.96 |
| O4 | 10 | 18.18 | 8 | 13.79 | 4 | 21.05 | 0 | 0.00 | 1 | 33.33 | 23 | 15.75 |
| O5 | 7 | 12.73 | 2 | 3.45 | 0 | 0.00 | 4 | 36.36 | 0 | 0.00 | 13 | 8.90 |
| O6 | 1 | 1.82 | 2 | 3.45 | 1 | 5.26 | 2 | 18.18 | 0 | 0.00 | 6 | 4.11 |
| O7 | 0 | 0.00 | 2 | 3.45 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 2 | 1.37 |
| O8 | 0 | 0.00 | 2 | 3.45 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 2 | 1.37 |
| O9 | 1 | 1.82 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 1 | 0.68 |
| O10 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 1 | 5.26 | 0 | 0.00 | 1 | 33.33 | 2 | 1.37 |
| O11 | 1 | 1.82 | 2 | 3.45 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 3 | 2.05 |
| O12 | 1 | 1.82 | 1 | 1.72 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 2 | 1.37 |
| 未分型 | 2 | 3.64 | 0 | 0.00 | 1 | 5.26 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 3 | 2.05 |
| 合计 | 55 | 100.00 | 58 | 100.00 | 19 | 100.00 | 11 | 100.00 | 3 | 100.00 | 146 | 100.00 |

2.4.2 不同年份 O 抗原群分布情况

不同年份 V_p 分离株 O 抗原群分布情况见表 4。2014 年以 O1、O2、O3 型为主,2015 年和 2016 年以 O1、O2、O4 型为主,且 O2 和 O4 型占比有逐年升高的趋势。

表4 不同年份 V_p 分离株 O 抗原群分布情况

| O 抗原群 | 2014 年 | | 2015 年 | | 2016 年 | |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 菌株数 | 构成比(%) | 菌株数 | 构成比(%) | 菌株数 | 构成比(%) |
| O1 | 11 | 22.45 | 11 | 21.57 | 11 | 23.91 |
| O2 | 11 | 22.45 | 14 | 27.45 | 15 | 32.61 |
| O3 | 11 | 22.45 | 2 | 3.92 | 3 | 6.52 |
| O4 | 5 | 10.20 | 8 | 15.69 | 10 | 21.74 |
| O5 | 5 | 10.20 | 4 | 7.84 | 4 | 8.70 |
| O6 | 0 | 0.00 | 4 | 7.84 | 2 | 4.35 |
| O7 | 0 | 0.00 | 1 | 1.96 | 1 | 2.17 |
| O8 | 0 | 0.00 | 2 | 3.92 | 0 | 0.00 |
| O9 | 0 | 0.00 | 1 | 1.96 | 0 | 0.00 |
| O10 | 1 | 2.04 | 1 | 1.96 | 0 | 0.00 |
| O11 | 2 | 4.08 | 1 | 1.96 | 0 | 0.00 |
| O12 | 1 | 2.04 | 1 | 1.96 | 0 | 0.00 |
| 未分型 | 2 | 4.08 | 1 | 1.96 | 0 | 0.00 |
| 合计 | 49 | 100.00 | 51 | 100.00 | 46 | 100.00 |

分析仪 GN 卡鉴定,结果概率均达 95% 以上,置信度均达非常好的鉴定及以上。

2.4 O 抗原群分布情况

2.4.1 不同种类海产品 O 抗原群分布情况 见表 3。146 株菌株分属于 12 个不同 O 抗原群,并有 3 株菌株未能分群。O 抗原群主要集中在 O1、O2、O3、O4,这 4 型占有血清型的 76.71%。鱼类、贝壳类、头足类海产品均以 O1、O2、O4 型为主;而甲壳类海产品以 O5、O2、O6 型为主。

2.5 毒力基因 tdh、trh 检测结果 146 株分离株,仅从 2015 年 5 月份的 1 份伍子鱼样品中检出一株携带 tdh 毒力基因的菌株(20150512SJ001),其他 145 株均未携带 tdh、trh 毒力基因,携带率 0.68%(1/146)。见图 1。

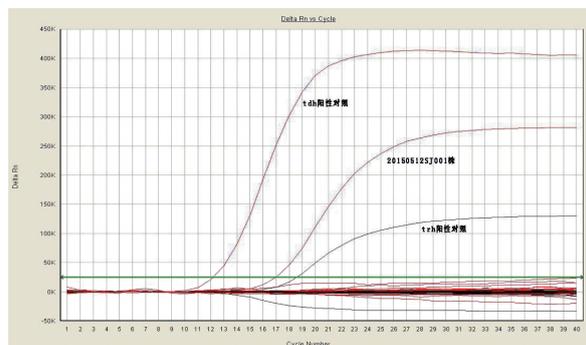


图1 分离株 tdh、trh 荧光定量 PCR 扩增曲线

2.6 药敏试验结果 分离株 AST-GN13 药敏试验结果,见表 5。146 株分离株均对氨基苄西林耐药,对氨基青霉素等 16 种抗生素敏感。

表5 分离株药敏试验结果

| 抗生素 | 结果 | 抗生素 | 结果 | 抗生素 | 结果 | 抗生素 | 结果 |
|------------|----|------------|----|-----------|----|------------|----|
| 氨苄西林(SAM) | R | 头孢他啶(CAC) | S | 亚胺培南(IPM) | S | 左氧氟沙星(LEV) | S |
| 氨苄青霉素(AMP) | S | 头孢曲松(CTRX) | S | 阿米卡星(AK) | S | 呋喃妥因(NIF) | S |
| 哌拉西林(TZP) | S | 头孢吡肟(FEP) | S | 庆大霉素(CN) | S | | |
| 头孢唑林(KZ) | S | 复方新诺明(SXT) | S | 妥布霉素(TOB) | S | | |
| 头孢替坦(CTT) | S | 氨基甙(AZT) | S | 环丙沙星(CIP) | S | | |

注:R表示耐药;S表示敏感。

3 讨论

副溶血性弧菌是引起食源性疾病的主要致病菌之一。VP共有13个O抗原血清型和71个K血清型。毒力因子主要有耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)和耐热相关溶血毒素(TDH-related hemolysin, TRH)。前者能引起神奈川现象,具有致死毒性、心脏毒性、细胞毒性和肠毒素作用;后者与TDH有相似的免疫原性和67%的相同氨基酸序列,并同样具有致死作用和细胞毒性。

通过对思明区市售各类海产品Vp进行定性检测,思明区海产品Vp污染率高达81.11%,表明思明区海产品Vp污染较为普遍,这与陈永红等^[6]的报道一致,但比彭少杰等^[7-9]报道的污染率高,这可能Vp污染水平存在地域差异,也有可能和样品种类、采样月份、检验方法不同有关。经统计学分析,各类海产品污染率差异均无统计学意义;不同月份污染率不同,其中7、8、9月份污染率均较5月份高。这主要是因为7、8、9月份气温较5月份高,有利于Vp的生长和繁殖,使得海产品更容易被Vp污染,这也与思明区细菌性食物中毒在上述月份(7-9月份)发生较多基本一致。鉴于思明区海产品Vp污染较为普遍,具有较高的食品安全风险,提示在这些月份应加强海产品Vp风险监测,进行风险评估,采取有效措施控制Vp引起的食品安全事件和食源性疾病的发生。

监测分离的146株Vp菌株分属于12个不同O抗原群,其中有3株分离株未能分型,表明海产品Vp血清群分布广泛,呈多样化状况。分离株O抗原群主要集中在O1、O2、O3、O4,这4型占有血清型的76.71%,鱼类、贝壳类、头足类海产品均以O1、O2、O4型为主;而甲壳类以O5、O2、O6型为主。不同年份O抗原群有所差异,2014年以O1、O2、O3型为主,2015年和2016年均以O1、O2、O4型为主,且O2和O4群占比有逐年升高的趋势。引起主要血清型发生变化的原因不明,有待进一步研究。药敏试验结果表明,Vp未发生明显的耐药性改变,所有菌株对头孢曲松等16种抗生素敏感,对氨苄西林耐药。tdh、trh毒力基因检测,

仅一株菌株检出tdh毒力基因,检出率0.68%,表明Vp海产品污染株毒力基因携带率不高,这与国内外文献报道结果一致^[10-12]。监测结果表明,思明区市售海产品受到副溶血性弧菌的污染情况不容乐观,污染率为81.11%,思明区是厦门市的中心城区,餐饮旅店业发达,海产品又是最受民众欢迎的食物之一,而海产品在加工制作过程中如果操作不当,加热不彻底,贮藏时时间和温度不当,或其它食物交叉污染,容易导致副溶血性弧菌大量繁殖,存在着较大的食品安全风险,应该引起食品安全监管机构、食源性疾病预防机构的高度重视。相关部门应采取有效的防控措施,加大食品安全卫生宣传力度,对餐饮从业人员加强食品安全强培训和健康教育,加强餐饮业的监管和督查执法,引导民众养成健康安全的饮食习惯,减少发生Vp引起的食源性疾病的风险。

参考文献

- [1] 刘丽萍,徐岚,李薇薇,等. 8起副溶血性弧菌食物中毒分子流行病学特征分析[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(1):9-13.
- [2] 秦向阳,刘萍,诸芸,等. 2003-2014年无锡市食物中毒流行病学分析[J]. 实用预防医学,2017,24(1):33-35.
- [3] 郑晓南,李瑞,侯君,等. 大连市2012-2013年食源性致病菌监测结果分析[J]. 实用预防医学,2015,22(3):340-342.
- [4] 高亚色,杨帆,王坤明. 2007-2011年细菌性食源性疾病病原菌检测结果分析[J]. 现代预防医学,2015,42(22):4074-4076.
- [5] 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[S]. 2013:1-13.
- [6] 陈永红,李晶,唐雨德,等. 南京夏秋季海产品中副溶血性弧菌的污染监测及其毒力与耐药性[J]. 实用预防医学,2012,19(4):500-502.
- [7] 彭少杰,田明胜,王颖,等. 2008-2010年上海市夏秋季市售海产品中副溶血性弧菌污染监测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(5):469-471.
- [8] 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):424-426.
- [9] 梅玲玲,潘雪霞,朱敏,等. 浙江省副溶血性弧菌污染水平及贝类海产品风险评估[J]. 中国人兽共患病学报,2012,28(7):700-704,717.
- [10] 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.
- [11] 陈志芸,施春雷,周秀娟,等. 上海市海产品中副溶血性弧菌的分布状况[J]. 中国食品学报,2015,15(8):196-202.
- [12] Nishibuchi M, Kaper JB. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: virulence gene acquired by a marine bacterium[J]. Infect Immun, 1995, 63(6):2093-2099. 收稿日期:2018-02-08