上海市水产品副溶血性弧菌的污染情况及毒力基因分布

张玉洁[1,2]，孙晓红[*1,2]，周彤彤[1,2]，赵 勇[1,2]，吴启华[3]，潘迎捷[1,2]

（1. 上海海洋大学 食品学院，上海 201306；2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室（上海），上海 201306；3. 美国 USDA-ARS 研究中心，美国加利福尼亚州 94710）

摘要：副溶血性弧菌是引起沿海城市食源性疾病爆发的主要致病菌之一。为了调查 2015 年 7 月—2016 年 6 月上海市内水产品中副溶血性弧菌的污染情况及毒力菌株的分布，根据 GB/T 4789. 2013《食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验》方法结合聚合酶链式反应及环介导等温扩增技术，从 206 份水产样品中分离出 201 株疑似副溶血性弧菌，挑取疑似菌株接种至科玛嘉弧菌显色培养基并获取最大可能数，提取菌株基因组 DNA 对其进行毒力基因鉴定。从上海芦潮港码头收集 71 份样品中，有 59 份样品中分离出副溶血性弧菌，污染量为 88.36 MPN/hg。上海市水产市场采样副溶血性弧菌污染率高达 91.11%，污染量为 1 361.76 MPN/hg。其中，*tdh*、*trh* 阳性菌株污染率分别为 1.6%、1.0%，均分离自虾中。研究表明，上海市售水产品中虾类是总副溶血性弧菌及致病性副溶血性弧菌污染率最高的水产品种类。水产品市场相对于自然环境而言具有更高的污染率和污染量，水产品捕捞后的一系列操作增加了副溶血性弧菌的污染。这些结果为上海市食源性疾病的防控提供了依据。

关键词：副溶血性弧菌；最大可能数；聚合酶链式反应；环介导等温扩增法

中图分类号：R 155　**文章编号：**1673-1689(2019)06-0153-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.06.021

Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and Virulence Genes Isolated from Seafood in Wharf and Market of Shanghai

ZHANG Yujie[1,2]，*SUN Xiaohong*[*1,2]，*ZHOU Tongtong*[1,2]，*ZHAO Yong*[1,2]，*WU Vivian ChiHua*[3]，*PAN Yingjie*[1,2]

（1. College of Food Sciences and Technology，Shanghai Ocean University，Shanghai 201306，China；2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation，Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation （Shanghai），Ministry of Agriculture，Shanghai 201306，China；3. Produce Safety and Microbiology Research Unit，USDA-ARS，CA 94710，USA）

Abstract：*Vibrio parahaemolyticus* is an intracellular pathogen responsible for seafood-borne outbreaks in coastal cities. The aim of this study was to investigate the profiles of *V.*

收稿日期：2016-12-12

基金项目：上海市科技兴农重点攻关项目（2015，4-5 号）；上海市科委工程中心建设项目（11DZ2280300）。

*** 通信作者：**孙晓红（1978—），女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事食品安全方面的研究。E-mail：xhsun@shou.edu.cn

引用本文：张玉洁，孙晓红，周彤彤，等. 上海市水产品副溶血性弧菌的污染情况及毒力基因分布[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(06)：153-159.

parahaemolyticus in seafood from Shanghai in 2015-2016. 201 suspected *V. parahaemolyticus* strains were isolated from 206 aquatic samples by rapid separable and detectable assays, including GB/T4789.2013, polymerase chain reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Suspected colonies were streaked onto CHROMagar Vibrio agar plate to determine the most probable number (MPN). DNA from the purple colonies was extracted for use as a template for PCR and LAMP detection. A total of 71 samples were collected from the sea wharf, 59 of these samples were tested positive for *V. parahaemolyticus* with levels as high as 88.36 MPN/hg. In contrast, the prevalence rate was 91.11% with levels as high as 1 361.76 MPN/hg for samples collected in the marketplace. The prevalence rates of tdh^+ and trh^+ were 1.6%, 1.0% respectively. These results showed that shrimp was a particular concern for total *V. parahaemolyticus* and *V. parahaemolyticus* (tdh^+/trh^+) contamination. Furthermore, the seafood marketplace has a higher contamination rate than natural environment. As shown in this study, the post-harvest practices increase the prevalence rate and level of *V. parahaemolyticus* in seafood. These results can be used to control outbreak of foodborne diseases in Shanghai.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, most probable number (MPN), polymerase chain reaction (PCR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

副溶血性弧菌是我国引起食物中毒的重要致病菌之一，人们食用生的、未完全煮熟或操作不当引起的副溶血性弧菌污染的水产品可引起腹泻、呕吐甚至死亡[1-2]。据卫计委统计数据显示，2013—2015年全国发生的微生物性食物中毒事件中，副溶血性弧菌是主要的病原之一[3-5]。美国CDC数据显示，每年美国发生大约7 880起由弧菌引起的疾病中，有2 800起病例是由食用污染副溶血性弧菌的食物引起。副溶血性弧菌的致病性与副溶血性弧菌的污染量和是否携带致病基因密切相关。研究发现，当致病性副溶血性弧菌污染水平高于1×10^3 cfu/mL或1×10^4 cfu/mL时，引发疾病的概率超过0.1%[6]。副溶血性弧菌的主要致病基因是溶血素相关基因，耐热直接溶血素（thermostable direct haemolysin，*tdh*）和耐热相关溶血素（tdh-related haemolysin，*trh*）。绝大多数从水产品中分离的副溶血性弧菌为tdh^- trh^-菌株，不具有致病性[6-7]。但对于tdh^+/trh^+阳性菌株而言，研究发现不同来源的副溶血性弧菌菌株携带毒力因子的种类可能不同[8-10]。Terzi等[8]研究发现鱼类来源的副溶血性弧菌未筛选到tdh^+trh^-菌株，而贝类来源副溶血性弧菌中未筛选到tdh^-trh^+菌株。

副溶血性弧菌广泛存在于河口、海洋、海水养殖池及各类海洋生物体内。近年来，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，尤其是沿海省市[11]。为确定上海市近年来水产品中副溶血性弧菌污染情况，本研究中于2015年7月至2016年6月分别对来自海洋和市售2种途径的水产品进行了副溶血性弧菌的分离、国标法定量检测、分子鉴定及毒力基因的筛查，旨在调查上海市水产品中副溶血性弧菌污染情况，为加强政府监管，追溯其污染来源、污染途径提供重要基础数据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

水产品样品购自上海市铜川路水产批发市场、上海市军工路水产批发市场和上海市芦潮港码头，采样时间为2015年7月至2016年6月，每月采样2-4次，共采集206份水产品样品。

1.2 主要试剂和培养基

硫代硫酸盐柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂平板（TCBS）、胰蛋白胨大豆肉汤液体培养基（TSB），北京路桥技术有限责任公司产品；科玛嘉弧菌显色培养基（CV），法国科玛嘉（CHROMagar）公司产品；BIOWEST regular agarose G-10，法国BIOWEST公司产品；TIANamp Bacteria DNA Kit细菌基因组DNA提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司产品；引物、Permix Taq，宝生物工程（大连）有限公司；Bst DNA polymerase large fragment New England Biolab。

1.3 主要仪器设备

去离子水 Milli-Pure，超纯水 Milli-Q，美国 Millipore Sigma 公司;电热恒温水浴锅,上海申生科技有限公司产品;振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司产品;隔水式恒温培养箱,上海一恒科技有限公司产品;ESCO 超净工作台，美国 Airstream 公司产品;Bio-Tek 酶标仪，美国伯腾仪器有限公司;产品 Eppendorf 离心机 5810R,美国 Eppendorf 公司产品;PCR 仪，美国 Eppendorf 公司产品;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂制造;高压灭菌锅,日本 TOMY KOGYO 公司产品;微型振荡器,美国 Fisher 公司产品;Bio-Rad 凝胶成像分析仪,美国伯乐公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 样品采集 每份样品的采集均进行独立包装,袋内打氧运输,2 h 内送达实验室,进行样品预处理。

1.4.2 菌株的分离 按照国标 GB/T 4789.7-2013,对副溶血性弧菌进行分离,选用硫代硫酸钠柠檬酸胆盐蔗糖培养基(TCBS)和科玛嘉弧菌显色培养基(CV)筛选疑似菌株。

1.4.3 MPN 值计算 按照国标 GB/T 4789.7-2013 定量检测方法,取 25 g 样品至 225 g APW 中,拍打式均质机拍击 2 min,将处理后的均质液进行 10 倍梯度稀释。接种环挑取最适梯度的稀释液,划线于 TCBS 平板及 CV 平板上,置于 37 ℃恒温培养箱,培养 18~24 h。根据《副溶血性弧菌最可能数(MPN)检索表》计算 MPN 值。

1.4.4 基因组 DNA 的提取 挑取疑似副溶血性弧菌单菌落接种于 30 g/L 氯化钠 TSB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min，培养 3~4 h。按照 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA,Bio-Tek 酶标仪测定基因组 DNA 的质量浓度。

1.4.5 毒力基因的 PCR 检测 以获得的基因组 DNA 为模板，副溶血性弧菌标准菌株 33847 为 *tdh* 阳性对照，副溶血性弧菌标准菌株 17802 为 *trh* 阳性对照,进行副溶血性弧菌的 PCR 鉴定(*tlh*)及其毒力基因 *tdh*,*trh* 的鉴定,引物序列及反应条件参照高玮等[12]。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行观察,取 5.0 μL PCR 产物点样于 0.02 g/mL 的琼脂糖凝胶中,180 V 电压下电泳 30 min,EB 染色 10 min,利用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪观察结果，拍照获取琼脂凝胶电泳图谱。

1.4.6 毒力基因的 LAMP 检测 以获得的基因组 DNA 为模板，副溶血性弧菌标准菌株 33847 为 *tdh* 阳性对照，副溶血性弧菌标准菌株 17802 为 *trh* 阳性对照,进行副溶血性弧菌 *tlh* 基因、*tdh* 基因和 *trh* 基因的 LAMP 检测,引物序列及反应条件参照韩小龙等[13-14]。LAMP 产物用琼脂糖凝胶电泳进行观察,取 3.0 μL LAMP 产物点样于 0.02 g/mL 的琼脂糖凝胶中,180 V 电压下电泳 25 min,EB 染色 10 min,利用 Bio-Rad 凝胶成像分析仪观察结果,拍照获取琼脂凝胶电泳图谱。

2 结果与分析

2.1 不同类型水产品中副溶血性弧菌污染率

为了解上海市不同类型水产品中副溶血性弧菌的分布情况,2015 年 7 月至 2016 年 6 月对采集的鱼、虾、蟹、贝 4 大类 14 种共 206 份水产样品进行副溶血性弧菌的定性和定量检测,结果如表 1 所示。206 份水产样品中有 182 份样品检测出副溶血性弧菌,污染率达 88.34%,其中污染率最高的水产品为虾类，污染率为 95.18%(79/83)，其次为蟹类(88.8%,8/9)、贝类(83.63%,92/110)。根据国标 GB/T 4789.7-2013 定量检测副溶血性弧菌的污染量,结果表明污染量最高的是虾类，为 2 156.57 MPN/hg,其次是贝类(84.78 MPN/hg)。可以发现草虾的污染率(100%)和污染量(5 168.21 MPN/hg)均高于其他水产品种类。基围虾、斑节虾、牡蛎、梭子蟹等日常食用海鲜污染亦较为严重。

2.2 不同地点来源的水产品中副溶血性弧菌污染率

不同地点来源的水产品中副溶血性弧菌的分布状况不同,为了解其差异性,本研究中分别从上海市铜川路水产市场、上海市军工路水产市场和上海芦潮港码头采集 206 份水产品,副溶血性弧菌污染率如表 2 所示。水产品市场共采样 135 份,污染率为 91.11%,MPN 值为 1 361.76 MPN/hg。码头共采样 71 份海产品，污染率为 83.09%,MPN 值为 88.36 MPN/hg。研究表明无论是污染率还是 MPN 值,水产品市场都远远高于码头。

2.3 不同季节水产品副溶血性弧菌污染率

为探究水产品中副溶血性弧菌的污染情况与季节之间的相关性，本研究中对不同季节采集的 206 份水产品进行副溶血性弧菌分析，其中夏季污

表 1　不同种类水产品副溶血性弧菌污染率

Table 1　Prevalence of *V. parahaemolyticus* in seafoods

水产品类型	种类	样品数	阳性样品数	污染率	平均污染率	MPN/100g	平均 MPN/hg
虾类	白米虾	10	8	80%	95.18%	381.22	2 156.57
	斑节虾	14	14	100%		652.0	
	草虾	25	25	100%		5 168.21	
	红爪虾	7	6	85.7%		5.37	
	基围虾	22	21	95.4%		1 663.51	
	皮皮虾	4	4	100%		52.61	
	沼虾	1	1	100%		4.6	
贝类	牡蛎	62	55	88.7%	83.63%	116.9	84.78
	扇贝	39	31	79.4%		42.25	
	带子	1	0	0%		0	
	青口	8	6	75%		57.74	
蟹类	梭子蟹	9	8	88.8%	88.8%	47.28	47.28
鱼类	棘头梅童鱼	2	1	50%	75%	0.11	0.12
	黄鱼	2	2	100%		0.13	
总计		206	182	88.3%		924.81	

染率高达 97.33%，其次是秋季（93.22%）、春季（80.55%），冬季相较于其他三季来说污染率较低，为 69.44%。夏季是副溶血性弧菌生长繁殖的最适季节，因而 MPN 值也远高于其他 3 个季节，为 1 579.17 MPN/hg。

表 2　不同采样地点水产品中副溶血性弧菌污染率

Table 2　Prevalence of *V. parahaemolyticus* in seafood purchased from market and wharf

采样地点	样品数	阳性样品数	污染率/%	MPN/hg
铜川路水产市场	131	119	90.83	1 403.53
军工路水产市场	4	4	100	4.73
芦潮港码头	71	59	83.09	88.36
总计	206	182	88.34	924.81

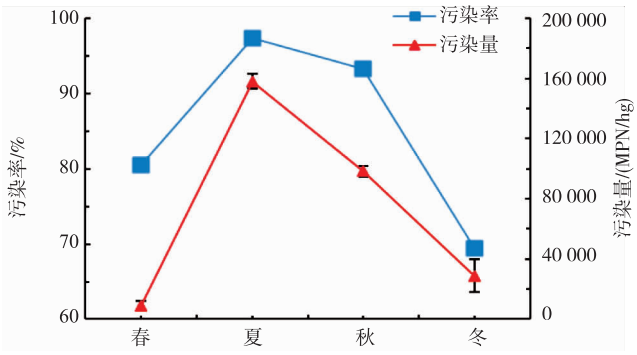
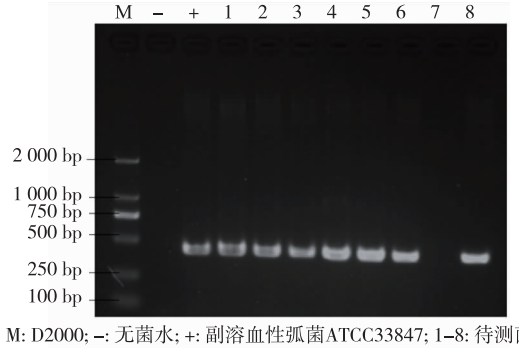


图 1　不同季节水产品副溶血性弧菌污染情况

Fig. 1　Prevalence of *V. parahaemolyticus* in different season

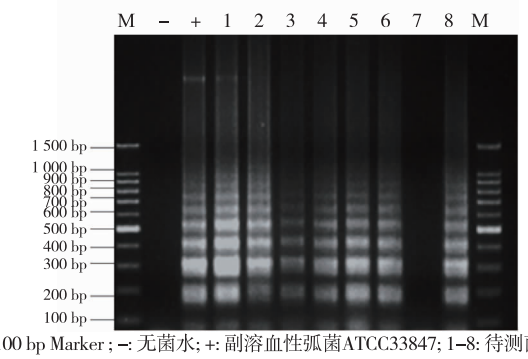
2.4　疑似副溶血性弧菌的 PCR、LAMP 鉴定

副溶血性弧菌在 TCBS 选择性培养基上菌落形态为圆形湿润绿色浑浊菌落，在 CV 板上为淡紫色圆形湿润菌落。通过 2 种不同的副溶血性弧菌选择性培养基共筛选，获得 201 株疑似副溶血性弧菌菌株。选取 *tlh* 基因，对疑似副溶血性弧菌分别进行 PCR、LAMP 鉴定，共鉴定出 182 株副溶血性弧菌株。部分疑似副溶血性弧菌株的鉴定结果如图 2。



M: D2000; –: 无菌水; +: 副溶血性弧菌ATCC33847; 1–8: 待测菌株

(a)PCR-*tlh*电泳



M: 100 bp Marker; –: 无菌水; +: 副溶血性弧菌ATCC33847; 1–8: 待测菌株

(b)LAMP-*tlh*电泳

图 2　部分菌株 PCR–*tlh* 及 LAMP–*tlh* 电泳

Fig. 2　Agarose gel electrophoresis of *tlh* PCR and LAMP products

2.5 副溶血性弧菌 *tdh* 基因和 *trh* 基因 PCR、LAMP 扩增结果

tdh、*trh* 2 个基因作为副溶血性弧菌的主要毒力基因,为了解其在水产品中的分布状况,采用 PCR 和 LAMP 2 种方法,以标准菌株 ATCC33847 作为 *tdh* 基因阳性对照,ATCC17802 作为 *trh* 基因阳性对照,对 182 株副溶血性弧菌进行 *tdh* 基因和 *trh* 基因的扩增。结果显示共筛选出 5 株含有 *tdh* 或 *trh* 基因的副溶血性弧菌菌株,部分菌株 *tdh* 基因和 *trh* 基因 PCR 及 LAMP 检测结果如表 3。

表 3 部分水产品中分离副溶血性弧菌毒力基因检测结果

Table 3 Prevalence of *V. parahaemolyticus* in seafood purchased from market and wharf

菌株号	PCR-*tdh*	LAMP-*tdh*	PCR-*trh*	LAMP-*trh*
SHOU-VP06111	-	-	+	+
SHOU-VP07105	-	-	-	-
SHOU-VP07131	-	-	-	-
SHOU-VP07132	-	-	-	-
SHOU-VP07134	-	-	-	-
SHOU-VP07135	-	-	-	-
SHOU-VP07152	-	-	+	+
SHOU-VP07153	-	-	-	-
SHOU-VP07154	-	-	-	-
SHOU-VP01145	+	+	-	-
SHOU-VP01241	-	-	-	-
SHOU-VP01248	+	+	-	-
SHOU-VP02287	+	+	-	-
SHOU-VP03296	-	-	-	-
SHOU-VP04271	-	-	-	-

2.6 不同水产品中致病性副溶血性弧菌检出率

为了解不同类型水产品中致病性副溶血性弧菌的分布情况,对分离获得的 182 株副溶血性弧菌进行毒力基因的分析,结合菌株的来源分析致病性副溶血性弧菌在水产品中的分布,结果如表 4 所示。含 *tdh* 基因的副溶血性弧菌菌株 3 株,污染率为 1.6%,含 *trh* 基因的副溶血性弧菌菌株 2 株,污染率为 1.0%。3 株 *tdh* 和 2 株 *trh* 阳性菌株均分离自虾,贝类、蟹类、鱼类均未分离出 tdh^+或 trh^+副溶血性弧菌菌株。

副溶血性弧菌作为沿海国家和城市爆发食源性疾病的首要致病菌,近几年,中国各地疾病预防中心对所在地水产品副溶血性弧菌检测越来越多[15]。本研究中从 206 份水产品中共分离鉴定出 182 株副溶血性弧菌,总污染率为 88.34%。其中草虾污染量在所有水产品中最高,为 5 168.21 MPN/hg,高于虾类平均污染量一倍。无论是污染率还是污染量,虾类水产品都远远高其他水产品种类,污染情况较为严重。叶兵等[16]对 2012 年 4—11 月青岛市海产品副溶血性弧菌污染情况进行检测,副溶血性弧菌总污染率为 20.39%,其中虾类污染率为 23.8%,贝类为 21.57%,虾类污染率高于贝类,与本研究结果相符。本研究中草虾均进口于泰国,Thongjun 等[17-18]数据显示 2006—2010 年泰国南部副溶血性弧菌污染率较高且呈现逐步上升趋势,这也解释了本研究草虾的高污染率及高污染量。本研究中副溶血性弧菌

表 4 不同种类水产品含 *tdh* 或 *trh* 基因副溶血性弧菌菌株检出率

Table 4 *V. parahaemolyticus* strains containing tdh^+/trh^+ genes in different seafood

水产品种类	样品数	菌株数	tdh^+菌株	trh^+菌株	tdh^+检出率	trh^+检出率
白米虾	10	8	1	0	12.5%	0%
斑节虾	14	14	1	0	7%	0%
草虾	25	25	1	1	4%	4%
红爪虾	7	6	0	0	0%	0%
基围虾	22	21	0	1	0%	4.7%
皮皮虾	4	4	0	0	0%	0%
沼虾	1	1	0	0	0%	0%
牡蛎	62	55	0	0	0%	0%
扇贝	39	31	0	0	0%	0%
带子	1	0	0	0	0%	0%
青口	8	6	0	0	0%	0%
梭子蟹	9	8	0	0	0%	0%
棘头梅童鱼	2	1	0	0	0%	0%
黄鱼	2	2	0	0	0%	0%
总计	206	182	3	2	1.6%	1%

总污染率高于其他研究,可能是因为采样种类的侧重不同,虾类和贝类样品数较其他种类来说较多,水产品产地污染率较高。

本研究中在上海芦潮港码头收集 71 份样品,其中 59 份样品中分离出副溶血性弧菌,污染量为 88.36 MPN/hg,而在上海市水产批发市场采样副溶血性弧菌污染率高达 91.11%(123/135),污染量为 1 361.76 MPN/hg。水产品市场相对于自然环境而言具有更高的污染率和污染量,可能是市售水产品在运输、贩卖等环节因操作不当,造成副溶血性弧菌的交叉污染。彭少杰等[19]对上海 2008—2010 年上海市不同地点副溶血性弧菌污染的调查也发现农贸市场和批发市场的污染率、污染量均高于其他采样点。因此,除了保证源头的安全以外,从农场到餐桌等一系列流程都应该加强监管,主动监测,为控制和防御食源性疾病的发生提供评估数据。

采用 TCBS 和 CV 2 种副溶血性弧菌选择性培养基共分离出 201 株疑似副溶血性弧菌,通过 LAMP 鉴定 182 株确认为副溶血性弧菌,选择性培养基的假阳性为 9.4%。陈志芸等[9]研究发现显色培养基假阳性结果为 10.1%,与本研究结果一致。目前众多研究广泛使用 MPN-PCR 方法,Goh 等[20-22]利用 MPN-PCR 的方法对肉类、蔬菜中的单增李斯特菌及副溶血性弧菌进行测定。本研究采用 MPN、TCBS、CV、PCR、LAMP 几种方法的结合使用,确保了实验结果的可靠性,且 LAMP 较 PCR 而言更加简便省时,PCR 又能防止 LAMP 的假阳性结果。

3 结 语

通过 PCR 和 LAMP 2 种方法对副溶血性弧菌主要毒力基因 *tdh*、*trh* 进行鉴定,182 株副溶血性弧菌中含 *tdh* 基因的共有 3 株,含 *trh* 基因的共有 2 株,均来自于虾中。总污染率分别为 1.6%、1.0%。其中虾类致病菌污染率达到 6.3%(*tdh*$^+$:3.8%,*trh*$^+$:2.5%,*tdh*$^+$ *trh*$^+$:0%)。陈志芸等[11]结果显示上海市售海产品中副溶血性弧菌 *tdh*、*trh* 携带率分别为 9.6%、1.0%,其中含有一株 *tdh*、*trh* 双阳性菌株(1%)。但 Yingkajorn 等[23-25]研究发现,从海产品中分离的副溶血性弧菌 *tdh/trh* 携带率为 0%~4.5%,总体研究表明自环境分离致病性副溶血性弧菌携带率较低。

参考文献:

[1] SERRACCA L,BATTISTINI R,ROSSINI I,et al. *Vibrio virulence genes* in fishes collected from estuarine waters in Italy[J]. **Lett Appl Microbiol**,2011,53(4):403-408.

[2] HARTH E,MATSUDA L,HERNANDEZ C,et al. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks,southern Chile[J]. **Emerg Infect Dis**,2009,15(2):163-168.

[3] 国家卫生计生委办公厅. 国卫办应急发(2013)11 号国家卫生计生委办公厅关于 2013 年第四季度全国食品中毒事件情况的通报[R]. 北京:国家卫生计生委办公厅,2013.

[4] 国家卫生计生委办公厅. 国卫办应急发 (2014)55 号国家卫生计生委办公厅关于 2014 年第三季度全国食品中毒事件情况的通报[R]. 北京:国家卫生计生委办公厅,2014.

[5] 国家卫生计生委办公厅. 国卫办应急发 (2015)56 号国家卫生计生委办公厅关于 2015 年第三季度全国食品中毒事件情况的通报[R]. 北京:国家卫生计生委办公厅,2015.

[6] FDA. Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic Vibrio PARAHAEMOLYTICUS IN Raw Oysters [R]. USA:FDA,2015.

[7] ODEYEMI O A,Incidence and prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood:a systematic review and meta-analysis[J]. **Springerplus**,2016,5:464.

[8] TERZI G,BUYUKTANIR O,YURDUSEV N,et al. Detection of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates in fish and mussels from middle black sea coast of turkey[J]. **Lett Appl Microbiol**,2009,49(6):757-763.

[9] TERZI G,MARTINEZ U J. Molecular characterizations of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood from the Black Sea,Turkey[J]. **Lett Appl Microbiol**,2016,62(6):494-500.

[10] VUDDHAKUL V,SOBOON S,SUNGHIRAN W,et al. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*

in three molluscan shellfish species (*Meretrixmeretrix*, *Pernaviridis*, and *Anadaragranosa*) and their association with foodborne disease in southern Thailand[J]. **Food Prot**, 2006, 69(11): 2615-2620.

[11] CHEN Zhiyun, SHI Chunlei, ZHOU Xiujuan, et al. Distribution status of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood markets of Shanghai [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2015(8): 196-202.(in Chinese)

[12] GAO Wei, PAN Yingjie, ZHAO Yong, et al. Isolation, identification, serotype and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquatic products in Shanghai markets[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(2): 278-282.(in Chinese)

[13] HAN Xiaolong, ZHANG Haiyan, CAO Mingxiu, et al. Detection of virulent *Vibrio parahaemolyticus* strains from commercial shellfish in Shanghai by loop-mediated isothermal amplification[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2015(9): 278-283.(in Chinese)

[14] ESCALANTE M O, KAYALI A Y, YAMAZAKI W, et al. Improvement of the quantitation method for the *tdh* (+) *Vibrio parahaemolyticus* in molluscan shellfish based on most-probable- number, immunomagnetic separation, and loop-mediated isothermal amplification[J]. **Front Microbiol**, 2015, 9.6: 270.

[15] LI Weiwei, WANG Xiaoying, GUO Yunchang, et al. Distribution of virulence genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood in China[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2010(3): 239-243.(in Chinese)

[16] YE Bing, WANG Benli, ZHANG Hongmei, et al. Seafoods vibrio parahemolyticus contamination investigation of Qingdao city in 2012[J]. **J Med Pest Control**, 2016(2): 217-218+221.(in Chinese)

[17] JUNTHIP T, PIMONSRI M A, MINGKWAN Y , et al. The trend of *Vibrio parahaemolyticus* infections in Southern Thailand from 2006 to 2010[J]. **Trop Med Health**, 2013, 41(4): 151-156.

[18] YOSHITSUGU N. Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and its virulent strains in seafood marketed in Thailand, Vietnam, Malaysia, and Indonesia[J]. **Trop Med Health**, 2013, 41(3): 95-102.

[19] PENG Shaojie, TIAN Mingsheng, WANG Yin, et al. Analysis on the contamination of seafoods caused by *Vibrio Parahaemolyticus* during summer and autumnin 2008-2010 in Shanghai markets[J]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2011(5): 469-471.(in Chinese)

[20] GOH S G, KUAN C H, LOO Y Y, et al. Listeria monocytogenes in retailed raw chicken meat in Malaysia[J]. **PoultSci**, 2012, 91(10): 2686-2690.

[21] KUAN C H, WONG W C, PUI C F, et al. Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in beef offal at retail level in Selangor, Malaysia[J]. **Braz Microbiol**, 2014, 44(4): 1169-1172.

[22] TUNUNG R, MARGARET S, JEYALETCHUMI P, et al. Prevalence and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* in raw salad vegetables at retail level[J]. **Microbiol Biotechnol**, 2010, 20(2): 391-396.

[23] YINGKAJORN M, SERMWITAYAWONG N, PALITTAPONGARNPIMP P, et al. *Vibrio parahaemolyticus* and its specific bacteriophages as an indicator in cockles(Anadaragranosa) for the risk of *V. parahaemolyticus* infection in Southern Thailand[J]. **Microb Ecol**, 2014, 67(4): 849-856.

[24] LEONI F, TALEVI G, MASINI L, et al. Trh (tdh^-/trh^+) gene analysis of clinical, environmental and food isolates of *Vibrio parahaemolyticus* as a tool for investigating pathogenicity[J]. **Int J Food Microbiol**, 2016, 225: 43-53.

[25] THEETHAKAEW C, FEIL E J, CASTILLO R S, et al. Genetic relationships of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical, human carrier, and environmental sources in Thailand, determined by multilocus sequence analysis[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2013, 79(7): 2358-2370.