

## 论著

## 北京口岸进口鲜活海产品中副溶血性弧菌致病性分析

陈广全 汪琦 曾静 张惠媛 张昕 张西萌  
(北京出入境检验检疫局技术中心,北京 100026)

**摘要:**目的 调查从北京口岸进口的鲜活海产品中是否存在致病性副溶血性弧菌。方法 对2005年从北京口岸进口的鲜活海产品中分离的267株副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的尿素酶活性、神奈川现象和毒性基因(*tdh*和 $trh$ )进行了检测。结果 267株副溶血性弧菌中27株尿素酶呈阳性,其中14株菌 $tdh$ 基因和 $trh$ 基因呈阳性。 $tdh$ 基因和 $trh$ 基因呈阳性的14株菌中有10株菌神奈川现象为阳性,并且全部分离自从加拿大进口的象拔蚌。结论 北京口岸进口的鲜活海产品中存在致病性副溶血性弧菌,主要集中在象拔蚌中。应对从加拿大进口的象拔蚌加强监管,防止致病性副溶血性弧菌引起食物中毒发生。

**关键词:**弧菌,副溶血性;海味;毒力;蚌科

特别是农村居民缺钙的主要原因。

我省动物内脏总体摄入水平偏低。我省居民油的消费量,特别是植物油显著上升。食盐摄入量超过推荐量的6 g水平。其它如糕点等食品的摄入量上升显著,特别是城市居民。

这些趋势与其他经济变迁国家的趋势相同。膳食结构趋向“高能量密度”,偏离了平衡膳食的要求,造成脂肪摄入过高以及健康食物摄入减少,慢性病的危险将因此增加。

因此,应进一步提高我省居民的膳食质量,要大幅度增加水果、奶制品及豆类制品的摄入量,提高居民膳食中优质蛋白比例和矿物质及维生素的摄入水平,使居民的膳食结构有所改善。同时,加大营养宣传力度,向居民宣传谷类和蔬菜在膳食中的意义,防止其摄入量的进一步下滑。在居民中强化清淡少盐的营养意识,减少膳食中油和盐的摄入。当前营养改善工作应从营养状况的双重负担的特点出发,同时解决营养不良和营养失衡的问题。充分利用各种形式向大众倡导平衡膳食及健康生活方式,提高居民自我保健意识和能力。

## 参考文献

[1] 翟凤英,何宇娜,王志宏,等.中国城乡居民膳食营养素摄入状况及变化趋势[J].营养学报,2005,27:181-184.

- [2] WHO/FAO. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation: diet, nutrition and the prevention of chronic diseases [R]. Geneva: WHO/FAO, 2003.
- [3] 葛可佑. 中国营养科学全书[M]. 北京:人民卫生出版社, 2004: 1275-1283.
- [4] 杨月欣,王光亚,潘兴昌. 中国食物成分表(2002) [M]. 北京:北京大学医学出版社, 2002.
- [5] 中国2000年人口普查资料[M]. 北京:中国统计出版社, 2001.
- [6] SHUFA D, TOM A M, FENGYING Z, et al. Rapid income growth adversely affects diet quality in China-particularly for the poor! [J]. Soc Sci Med, 2004, 59: 1505-1515.
- [7] 中国居民膳食指南专家委员会. 中国居民膳食指南文集 [C]. 北京:中国检察出版社, 1999.
- [8] HODGSON J M. Dietary fibre and blood pressure [J]. J Hypertens, 2004, 22: 25-26.
- [9] GIACCO R, CLEMENTE G, RICCARDI G. Dietary fibre in treatment of diabetes: myth or reality? [J]. Dig Liver Dis, 2002, 34 (suppl 2): s140-s144.
- [10] BARRY M P. The shift in stages of the nutrition transition in the developing world differs from past experiences [J]. Public Health Nutr, 2002, 51A: 223-229.
- [11] BRAY GA, PAERATAKUL S, POPKIN B M. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies [J]. Physiol Behav, 2004, 83: 549-555.
- [12] TANASESCU M, CHO E, MANSON J E, et al. Dietary fat and cholesterol and the risk of cardiovascular disease among women with type 2 diabetes [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79: 999-1005.

[收稿日期:2006-12-07]

中图分类号:R155.1;RZ263

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2007)03-0240-06

作者简介:陈广全 男 高级工程师

**Detection of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Imported Seafoods in Beijing**

CHEN Guang-quan, WANG Qi, ZENG Jing, ZHANG Hui-yuan, ZHANG Xin, ZHANG Xi-meng

(Testing Center of Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine

Bureau of the P. R. C, Beijing 100026, China)

**Abstract: Objective** To understand the situation of contamination of seafoods by *Vibrio parahaemolyticus*. **Methods** 2 349 batches of seafood imported to Beijing during March-October 2005 were examined for *V. parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* was discovered from 238 (10.13%) batches. These 238 strains and the other 29 strains isolated before were further examined for the ability to hydrolyze urea, kanagawa phenomenon (KP<sup>+</sup>) and the presence of *tdh* and *trh* genes. **Results** 27 strains were positive for urea hydrolysis, of which 14 strains were positive for *tdh* and *trh* genes. Among these 14 strains, 10 strains were positive for kanagawa phenomenon. All the KP<sup>+</sup> strains were isolated from samples of geoduck imported from Canada. **Conclusion** The results indicated that imported seafoods are contaminated by pathogenic *V. parahaemolyticus*, especially in geoduck from Canada.

**Key word:** *Vibrio parahaemolyticus*; seafood; Virulence; Unionidae

副溶血性弧菌是一种嗜盐的革兰阴性细菌,存在于海水中。人如果食用,尤其是生食了受该菌的某些特定菌株污染的海产品会导致肠胃炎的发生。国内外常有由副溶血性弧菌引发的食物中毒事件发生。副溶血性弧菌已成为由海产品引起的肠胃炎的一个主要的致病菌<sup>[1]</sup>。近两年来,从北京口岸进口的海产品呈持续增长态势,作为海产品中存在的重要致病菌之一的副溶血性弧菌,已经受到有关部门的高度重视。本文利用现代分子生物学方法,对从北京口岸进口的鲜活海产品中的副溶血性弧菌的致病性进行了调查,为有效控制致病性副溶血性弧菌随海产品进入我国提供可靠的方法基础。

## 1 材料和方法

1.1 实验菌株 从北京口岸进口海产品中分离的267株副溶血性弧菌。

1.2 试剂和仪器 尿素培养基、TSA-YE培养基和我妻培养基均购买自中国进出口商品检验技术研究北京陆桥技术有限责任公司。Taq酶和DNA分子量标记购买自大连宝生物。目的片段克隆试剂盒使用的是Invitrogen TA cloning试剂盒。所用引物在上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR仪,ABI 9700。

1.3 尿素酶活性检测 取副溶血性弧菌,穿刺接种尿素培养基(含2%氯化钠),37℃培养过夜。培养基颜色由肉色变为粉红色的为反应阳性,培养基颜色不变或变为淡黄色的为反应阴性。

1.4 神奈川实验 取副溶血性弧菌液体培养物(TSB-YE+3%NaCl)1μl,点种于我妻平板上,37℃培养24~48h。出现-溶血现象的为神奈川现象阳性,没有出现-溶血现象的为神奈川现象阴性。

1.5 毒性基因的检测 使用PCR法检测 *tdh* 基因

和 *trh* 基因。反应所用引物序列见表1。取副溶血性弧菌单克隆,重悬于适量生理盐水中。沸水煮10min后立即冰浴5min,13 000 r/min离心5min后取上清作为PCR反应模板。PCR反应体积为20μl,含有2μl 10×buffer(不含Mg<sup>2+</sup>),1.6μl 2.5mmol/L dNTP,1.2μl 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,10pmol/μl的上下游引物各0.8μl,1μl DNA模板,0.125μl Taq酶(5U/μl,Takara),用双蒸水补齐体积至20μl。使用ABI9700进行PCR反应。反应条件为94℃预变性4min;94℃变性30s,60℃退火30s,72℃延伸45s,反应30个循环后72℃延伸8min,4℃保存。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭(EB)染色后在凝胶成像系统中成像。

表1 检测 *tdh* 基因和 *trh* 基因所用的引物

引物	序列(5'-3')	扩增片段长度	参考文献
<i>tdh</i> - F	TGGAATAGAACCTTCATCTTACC	270 bp	[2]
<i>tdh</i> - R	GIAAAGGICTCTGACTTTTGGAC		
<i>trh</i> - F	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	500 bp	[2]
<i>trh</i> - R	TTGGCTTCGATATTTTCAGIATCT		

1.6 PCR产物的克隆与测序 使用Invitrogen TA cloning试剂盒。任意挑选2个270bp扩增产物和2个500bp扩增产物,按照试剂盒说明书将扩增产物克隆到载体。筛选出含有目的片段的菌株,送上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

## 2 结果

2.1 进口海产品中副溶血性弧菌检出情况 从2005年3月至2005年10月,共从2 349批海产品中检出受到副溶血性弧菌污染的样品238批,阳性率为10.13%(详见表2)。从加拿大进口的海产品中检出的副溶血性弧菌最多。分离得到的238株菌中

有 170 株来源于加拿大进口的海产品。

表 2 北京地区进口海产品中副溶血性弧菌阳性率表

样品名称	产地	检测数量(批)	阳性数量(批)	阳性率 %
象拔蚌	加拿大	674	63	9.35
珍宝蟹	加拿大	849	107	12.60
鲍鱼	澳大利亚	173	27	15.61
鲍鱼	南非	73	3	4.11
小龙虾	南非	384	37	9.64
三文鱼	挪威	196	1	0.51
合计		2349	238	10.13

2.2 尿素酶活性及致病性基因的检测情况 为了进一步对进口海产品中副溶血性弧菌的致病性进行调查,对 2005 年 3 月至 2005 年 10 月间分离并保存的副溶血性弧菌菌株及之前保存的副溶血性弧菌菌株共 267 株进行了尿素酶活性和毒性基因检测。检测结果显示有 27 株菌的尿素酶活性为阳性。其中有 14 株菌同时具有 *tdh* 和 *trh* 2 个毒性基因(见图 1,表 3)。这两个基因片段的序列已登录在 Genbank 上,检索号分别为 DQ345439、DQ345440、DQ345441 和 DQ345442。含有 *tdh* 基因,或含有 *trh* 基因,或 2 种基因同时具有的副溶血性弧菌菌株是有致病性的菌株<sup>[3]</sup>,因此,分离得到的 267 株副溶血性弧菌中有 14 株具有致病性。这 14 株菌分别来自象拔蚌(11 株)、珍宝蟹(2 株)和小龙虾(1 株)。

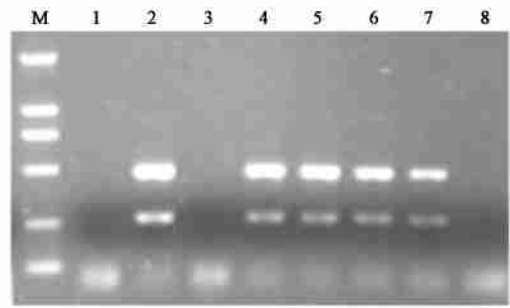
表 3 从海产品中分离的副溶血性弧菌的表型

样品名称	数量	UH <sup>+</sup> tdh <sup>-</sup> trh <sup>-</sup>	UH <sup>+</sup> tdh <sup>+</sup> trh <sup>+</sup>	UH <sup>-</sup> tdh <sup>-</sup> trh <sup>-</sup>
珍宝蟹	94	1	2	91
象拔蚌	63	8	11	44
小龙虾	57	1	1	55
鲍鱼	29	0	0	29
其他	24	3	0	21
合计	267	13	14	240

2.3 神奈川实验结果 将尿素酶活性为阳性的 27 株菌及尿素酶活性为阴性的 1 株菌(作为阴性对照)同时做神奈川实验,有 10 株菌呈神奈川阳性(见图 2)。这 10 株菌都具有毒性基因,而且全部来自象拔蚌。

### 3 讨论

自 1996 年以来,由副溶血性弧菌引起的集体中毒事件越来越多,尤其是在亚洲国家。因此,各国对副溶血性弧菌的监测也越来越重视。在我国,对水产品中副溶血性弧菌的监测力度仍很小。近两年



M, DNA ladder(分子量大小分别为1 500、1 000、750、500、250 和 100 bp)。泳道 1~7,尿素酶活性为阳性的副溶血性弧菌,但泳道 1,3 未检出 *tdh* 和 *trh* 基因。泳道 8,阴性对照。

图 1 副溶血性弧菌的 *tdh* 基因和 *trh* 基因 PCR 扩增结果

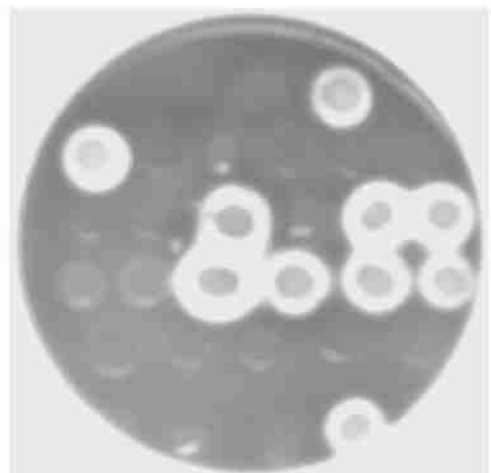


图 2 神奈川实验结果

来,从北京口岸进口的海产品增长迅猛,为了切实保护消费者的利益,2005 年检验检疫部门对海产品中的副溶血性弧菌进行了重点监测。

2005 年 3 月至 10 月期间,北京口岸进口的鲜活海产品中有 10.13% 的样品受到副溶血性弧菌污染。但是,分离得到的 267 个副溶血性弧菌中只有 14 株菌具有致病性(见表 3)。值得关注的是,本次调查检测出的可能具有致病性的海产品基本上都来自加拿大,尤其是象拔蚌。因此,应该加强对加拿大象拔蚌的监测。

尿素酶与副溶血性弧菌的致病性到底有没有相关性现在还不清楚。Kaysner 等人认为尿素酶实验是筛选致病性副溶血性弧菌的一种简单有用的方法<sup>[4]</sup>。Osawa 等的研究结果却表明用尿素酶实验来筛选致病性副溶血性弧菌不可行<sup>[5]</sup>。Nakaguchi 等进一步证明尿素酶基因并不影响 *tdh* 基因和 *trh* 基因的表达<sup>[6]</sup>。从我们的实验结果来看,所有 *tdh* 基因呈阳性的菌株,其尿素酶活性均为阳性,该结果与 Kaysner 等人的结论相一致。

神奈川现象是传统判断致病性副溶血性弧菌的

[下转第 253 页]

表1 胶体金探针特异性的观察

菌种	株数	阳性株数	阴性株数	阳性率 (%)
肠杆菌科	19	1	18	5.3
金黄色葡萄球菌属	6	0	6	0.0
沙门菌属	26	0	26	0.0
志贺菌属	24	1	23	4.2
小肠结肠炎耶杆菌属	3	0	3	0.0
粪链球菌属	2	0	2	0.0
合计	80	2	78	2.5

2.4 稳定性 将新制备的与放置在 4℃ 冰箱保存 5 个月的大肠埃希菌 O157 H7 胶体金探针,用免疫层析法同时检测大肠埃希菌 O157 H7 的纯菌悬液,结果完全一致。

### 3 讨论

胶体金的制备大多数都是在水浴加热、快速搅拌的条件下完成的,这种作法中的人为因素较多,且时间长、重复性也不是很好。为此,我们利用了微波炉加热的方法制备胶体金,从而大大节省了制备时间,且每次制备的胶体金的重复性相当好。为大量制备胶体金打下了良好的基础。

大肠埃希菌 O157 H7 是重要的食源性致病菌,对该菌的检测目前国际通常先以山梨醇麦康凯琼脂 (SMAC) 进行初筛,然后用生化和血清学试验做鉴

定,一般需要 24~48 h。Park 等<sup>[17]</sup>用免疫荧光法可以在 2 h 内完成对该菌的检测。此外,还有免疫磁化分离法,PCR 及基因芯片检测法等,但这些方法所需仪器设备昂贵,且操作繁琐复杂。我们所建立的胶体金免疫层析法,不需要特殊的仪器设备,所用的国产试剂价廉,操作简便、特异性强,且可在很短的时间内出结果。

### 参考文献

- [1] RILEY W, REMIS R S, HELGERSON S D, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype [J]. *New Engl J Med*, 1983, 308: 681-685.
- [2] 权太淑, 范天锐, 李乐民, 等. 首次从出血性结肠炎病人中分离到 O157 H7 大肠埃希菌 [J]. *中华流行病学杂志*, 1988, 9 (腹泻病特刊): 24-29.
- [3] 宋农, 李君文, 王新为, 等. 胶体金探针制备及滴金免疫法检测产肠毒素金葡菌 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 9: 1143-1145.
- [4] 李成文. 免疫化学研究进展 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 50-56.
- [5] 王文勇, 李玉松, 赵一岭. 一种快速、稳定制备胶体金的新方法 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1997, 13 (增刊 1): 18-19.
- [6] 严杰, 罗海波, 陆德源. 现代微生物学实验技术及其应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 222-223.
- [7] PARK C H, HIXON D L, MORRISON W L, et al. Rapid diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 H7 directly from fecal specimens using immunofluorescence stain [J]. *Am J Clin Pathol*, 1994, 101 (1): 91-94.

[收稿日期: 2006-12-20]

中图分类号: R15; Q939.122; R378.21

文献标识码: B

文章编号: 1004-8456(2007)03-0251-03

[上接第 247 页]

重要依据。但在本次调查中,并不是所有具有毒性基因的菌株都呈神奈川现象阳性。14 株具有毒性基因的菌株中有 4 株呈神奈川阴性,10 株呈神奈川现象阳性。这表明 PCR 检测毒性基因的方法比传统的神奈川实验在判断副溶血性弧菌的致病性上更准确。

### 参考文献

- [1] BLAKE P A, WEAVER R E, HOLLIS D G. Disease of humans (other than cholera) caused by vibrios [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1980, 34: 341-367.
- [2] KAYSNER C A, DEPAOLA A. *Vibrio*. food and drug administration bacteriological analytical manual [M]. 8th ed. Revision A, 1998. Chapter 9. Substantially rewritten and revised, 2004.
- [3] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Thermostable direct hemolysin gene of

*Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. *Infect Immun*, 1995, 63: 2093-2099.

- [4] KAYSNER C A, ABEYATA C, TROST P A, et al. Urea hydrolysis can predict the potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in the Pacific Northwest [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 3020-3022.
- [5] OSAWA R, OKITSU T, MOROZUMI H, et al. Occurrence of Urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related hemolysin genes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62 (2): 725-727.
- [6] NAKAGUCHI Y, OKUDA J, LIDA T, et al. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene [J]. *Microbiol Immunol*, 2003, 47 (3): 233-239.

[收稿日期: 2006-11-23]

中图分类号: R155.55; R378.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2007)03-0245-04