

调查研究

2009—2012年上海市副溶血性弧菌血清分型研究

张红芝,顾其芳,刘诚,刘玥,於颖

(上海市疾病预防控制中心,上海 200336)

摘要:目的 了解2009—2012年期间上海市副溶血性弧菌临床菌株和水产品分离株的血清型分布。方法 采用血清玻片凝集试验对622株临床菌株和176株水产品分离株进行血清分型。结果 622株副溶血性弧菌临床菌株可分为27个血清型,其中以O3:K6型为主,约占61.7%。176株副溶血性弧菌水产品分离株可分为9个O群,其中O1、O2、O3、O4和O5群为主要血清型,约占72.2%。水产品分离株与临床菌株的血清型差异较大,但在水产品中检测到2株临床菌株的优势血清型O3:K6。结论 2009—2012年期间上海市副溶血性弧菌临床菌株和水产品分离株的血清型均呈现高度多样性,O3:K6型是引起食物中毒的优势血清型,而水产品分离株未见优势血清型。临床菌株优势血清型O3:K6在水产品中的出现,提示上海市水产品存在潜在的致病危险,需要加强监控,为疾病的预防和控制提供依据。

关键词:副溶血性弧菌;血清型;流行病学调查;食源性致病菌

中图分类号:R155.3;TS206.1 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)04-0363-03

Study on the serotype of *Vibrio parahaemolyticus* isolates during 2009-2012 in Shanghai

ZHANG Hong-zhi, GU Qi-fang, LIU Cheng, LIU Yue, YU Ying

(Shanghai Center for Disease control and Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective Objective To study the serotype distribution of *Vibrio parahaemolyticus* clinical isolates and aquatic products isolates during 2009-2012 in Shanghai. **Methods** Using slide serum agglutination test to detect the serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* from 622 clinical and 176 aquatic samples. **Results** Among 622 clinical isolates, 27 serotypes were identified. The predominant serotype was O3:K6 (61.7%). It was shown that 176 aquatic strains could divide into 9 serum groups. The predominant serotype O3:K6 among clinical isolates was detected in two aquatic products. **Conclusion** The serotypes among clinical isolates and aquatic products showed high diversity. The predominant serotype O3:K6 among clinical isolates appeared in aquatic product representing a public health risk and requiring epidemiological and ecological monitoring to ensure safety.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; epidemiological investigation; food-borne pathogen

副溶血性弧菌是近年来引人关注的、重要的食源性致病菌,其广泛存在于海水、海底沉积物以及鱼等水产品中。人们食用被副溶血性弧菌污染的食物后易引起以腹痛、腹泻、恶心、呕吐、发热等为主要症状的急性胃肠炎。由该菌引起的食源性疾病在国内外均有报道,世界上沿海国家包括日本、美国、东南亚等一半以上的食物中毒事件是由其引起^[1-2],在中国沿海地区,副溶血性弧菌是居民夏、秋季食物中毒和急性腹泻的主要致病菌^[3]。副溶血性弧菌分类的主要基础是血清型,取决于菌体的抗原(O)和荚膜(K)的抗原特性。其血清型是利用O抗原和K抗原的组合(包括11种不同的O抗原

和65种不同的K抗原)来进行血清分型^[4],目前中国副溶血性弧菌血清分型资料不够全面,本研究对上海市2009—2012期间副溶血性弧菌临床菌株和其水产品分离株进行血清学分型,旨在为副溶血性弧菌感染预防和流行病学调查提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

溶血性弧菌散发临床菌株622株、水产品分离株176株均来自2009—2012年期间上海市食源性致病菌监测网和食品污染物监测网。

1.1.2 试剂

溶血性弧菌的血清分型诊断血清(Denka Seiken, Japan),该血清含O1~O11共11个O抗原诊断血清,65个K抗原诊断血清。

收稿日期:2013-06-10

基金项目:上海市自然科学基金(11ZR1431000)

作者简介:张红芝 女 博士 研究方向为食源性微生物

E-mail:wxws46@163.com

3.5%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、甘油、生理盐水,以上试剂均在有效期内使用,并经过质量控制。

1.2 方法

上菌株经生化试验确定后,按诊断血清使用说明要求,分别进行O、K抗原凝集试验。将菌种接种到3.5%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂试管斜面,36℃培养18h,用含5%甘油溶液冲洗斜面培养物,获得浓的菌悬液;O抗原鉴定:将菌悬液转移到离心管内,121℃灭菌1h,灭菌后离心,4000 r/min(离心半径为6cm)离心15min,弃上清,沉淀用生理盐水洗3次,每次离心,4000 r/min(离心半径6cm),离心15min,最后1次离心制成菌悬液,与O血清进行凝集,同时以生理盐水作为对照;如为阴性,则重复上面高压及洗涤步骤后检测;如仍未阴性,则培养物的O抗原属未知。K抗原鉴定:直接挑取少量3.5%氯化钠胰蛋白胨平板上的新鲜菌落,与多价K血清进行检测,出现凝集反应时再与单个血清进行检测,用生理盐水作对照。

2 结果

2.1 2009—2012年期间上海地区副溶血性弧菌临床菌株血清型

2009—2012期间收集的副溶血性弧菌临床菌株共有622株,约84%(523/622)的菌株可以同时被O:K抗血清凝集,可分为6个O群,共27个血清型(图1)。主要的血清型是O3:K6,占61.7%(384/622),其次是O4:K8(68),O4:K68(25)和O4:K9(14)。约13.5%(84/622)的菌株可与O抗血清凝集但不能与K抗血清凝集,分别为O1:KUT(46)、O2:KUT(1)、O3:KUT(26)、O4:KUT(7)、O5:KUT(2)、O8:KUT(2);约2.4%

(15/622)的菌株不能分型,即不能与O:K抗血清发生凝集。

图1显示,不同的年份其临床菌株的血清型不尽相同,但O3:K6血清型却是各年临床菌株的优势菌型。如2010年副溶血性弧菌临床菌株出现O4:K4、O3:K20、O4:K37、O5:KUT,而在其他年份未出现;2011年出现O4:K13、O4:K12、O2:K28、O1:K8,而在其他年份未见。

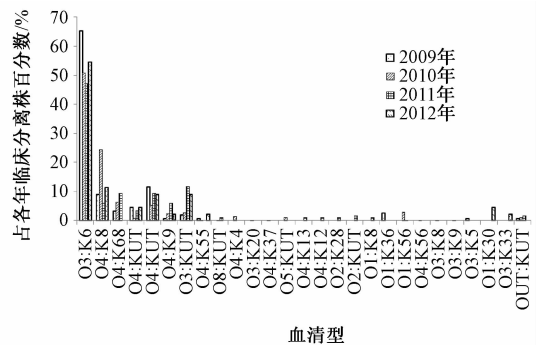


图1 2009—2012期间上海市副溶血性弧菌临床菌株血清型分布

Figure 1 The distribution of serotype of *V. parahaemolyticus* in Shanghai during 2009-2012

2.2 2009—2012年期间上海地区水产品中副溶血性弧菌分离株血清型

2009—2012年期间分析的水产品包括鱼、虾、贝类(牡蛎、海螺、蚌、蛤)和蟹,分离副溶血性弧菌共176株。如表1所示,完全分型的有27株,分型率为15.3%,共分为17个血清型,型别较多且分散,分布于O1、O2、O3、O4、O5、O10和O11共7个血清群,其中检出2株O3:K6型菌株。约84.7%(149/176)菌株不能被O:K抗血清同时凝集。

表1 2009—2012年期间副溶血性弧菌水产品分离株血清分型结果

Table 1 The serotypes of *V. parahaemolyticus* in aquatic products during 2009-2012

O血清群(菌株数)	血清型(菌株数)
OUT(11)	OUT: KUT(11)
OUT(4)	OUT: K24(1)、OUT: K13(1)、OUT: K1(1)、OUT: K2(1)
O1(29)	O1: KUT(25)、O1: K32(2)、O1: K33*(2)
O2(29)	O2: KUT(25)、O2: K28(3)、O2: K3(1)
O3(24)	O3: KUT(20)、O3: K28*(1)、O3: K6(2)、O3: K54(1)
O4(20)	O4: KUT(10)、O4: K2*(2)、O4: K34(3)、O4: K8(2)、O4: K29*(1)、O4: K9(2)
O5(26)	O5: KUT(24)、O5: K61(1)、O5: K17(1)
O6(1)	O6: KUT(1)
O8(1)	O8: KUT(1)
O10(16)	O10: KUT(14)、O10: K60*(1)、O10: K52*(1)
O11(15)	O11: KUT(14)、O11: K51*(1)

注: * 为新的血清型。

2.3 副溶血性弧菌临床分离株和水产品分离株中新的血清型

2009—2012年期间,上海市副溶血性弧菌临床

分离株和水产品分离株分离到一些新的菌型。从表1和图1结果可见,622株临床分离株有4株的血清型属于新菌型,分别为O3:K20、O4:K37、

O1: K8和 O1: K36。176株水产品分离株中有7株的血清型属于新菌型,分别为 O1: K33、O3: K28、O4: K2、O4: K29、O10: K60、O10: K52、O11: K51。

3 讨论

副溶血性弧菌是沿海地区引起食物中毒和急性腹泻的主要病原菌,它的抗原构造极为复杂,研究副溶血性弧菌临床分离株和环境分离株血清型的分布情况及它们之间的差异,对该病的预防控制具有重要的意义。

研究显示,2009—2012年期间上海地区副溶血性弧菌临床分离株以 O3:K6血清型为主,占61.7%,属于优势菌型,且无明显的地区差异,这与国内外的报道是一致的^[5-6]。加尔各答早期调查显示,O1: K56血清型曾经作为优势菌型在腹泻病人、回顾性追踪病例以及携带者中发现^[7-8]。血清型 O4: K12曾经是美国和墨西哥海岸线分离的副溶血性弧菌的优势菌型^[9],但这与 O3: K6型副溶血性弧菌引起的食物中毒事件大有不同,O3: K6血清型的流行可导致住院人数的迅速增加,同时作为优势血清型取代了上述地区存在的其他血清型。有研究报道在日本爱知县,副溶血性弧菌 O3: K6型所引起的爆发性食物中毒事件由1988—1995期间的3%增加到1996—2001期间的75%^[10]。

1995年以来,O3: K6流行克隆的出现导致许多国家副溶血性弧菌引起的感染大幅度增加,研究报道 O3: K6克隆流行株即 O3: K6血清型及其衍生血清型流行株已在亚洲国家形成了生态圈^[11]。已有研究证明,O3: K6血清型的衍生血清型是由环境株通过大片段的基因片段水平转移进行基因重组,首先获得毒力岛 VPal-3、VPal-2,继而获得 VPal-1、VPal-5,最后获得毒力岛 VPal-4而成,为适应环境变化通过基因水平转移而产生 O: K 抗原的转换,形成了包含一系列新的血清型的 O3: K6流行克隆株^[12]。通过检测大流行株的特异基因 *toxRS/new* 和 *tdh* 发现,目前在上海市 O3: K6克隆流行株的衍生血清型有 O4: K68、O4: K8、O4: KUT、O1: KUT、O3: KUT、O4: K4、O5: KUT、O4: K12、O1: 56^[13]。

2009—2012年期间上海地区副溶血性弧菌水产品分离株的血清型呈现多样性的特点,分别属于 O1、O2、O3、O4、O5、O6、O8、O10、O11共9个血清群,没有优势血清群,血清型变化的机制主要是通过编码荚膜 K 抗原及 O 抗原的基因突变、水平转移等方式进行,这种机制可能是细菌为适应环境变化以及逃避人类免疫系统的方法之一^[11]。

研究发现副溶血性弧菌临床分离株和水产品

分离株的血清型并不一致,临床菌株以 O3: K6为主,而水产品分离株中只检测到2株 O3: K6,这种现象与国内外文献报道类似^[14-16]。原因可能是由于引起副溶血性弧菌食物中毒的除水产品这个传染源外,还可能由其他因素引起,已经有研究报道副溶血性弧菌不仅通过水产品而且通过污染其他食品流行传播,农贸市场、大型超市、宾馆饭店的水产品销售和加工场所是副溶血性弧菌通过交叉污染并最终导致食物中毒及食源性疾病发生的关键场所^[17]。除 O3: K6外,还有其他血清型同样也在临床菌株中检出到,如 O4: K9, O4: K8和 O2: K28。提示仍要加强水产品的监测。

本研究发现11个新的血清型,其中只有 O1: K36在广东省被检测到^[5],其余在我国其他省份还没有发现。提示不同地区可能由于不同环境压力出现的新血清型也是有差异的。因此,需进一步加强对上海地区副溶血性弧菌的监测,为疾病的预防和控制提供依据。

参考文献

- [1] Laohaprerthisan V, Chowdhury A, Kongaumuang U, et al. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical isolates of *Vibrio parahaemolyticus* isolates in southern Thailand[J]. *Epidemiol Infect*,2003,130:395-406.
- [2] Daniels N A, Mac Kimon L, Bishop R. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998 [J]. *J Infect Dis*, 2000,181:1661-1666.
- [3] CHAO G, JIAO X, ZHOU X, et al. Distribution prevalence molecular typing and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in coastal province Jiangsu, China[J]. *Food Cont*,2009,20:907-912.
- [4] Iguchi T, Kondo S, Hisatune K. *Vibrio arahaemolyticus* O serotypes from O1 to O13 all produce R-type lipopolysaccharide: SDS PAGE and compositional augar analysis[J]. *FEMS Microbiol Lett*. 1955,130:287-292.
- [5] 黎薇,方伟,柯昌文,等. 广东省2003—2008年副溶血性弧菌血清学分型研究[J]. *中国病原生物学杂志*,2009,4(7): 485-488.
- [6] 周丽萍,王艳,徐岚,等. 江苏地区致病性副溶血性弧菌及大流行克隆的研究[J]. *中国卫生检验杂志*,2010,20(11): 2719-2721.
- [7] Chatterjee B D, Sen T. *Vibrio parahaemolyticus* serotypes in Calcutta, India[J]. *Bull WHO*, 1974,50:559-561.
- [8] Sircar B K, Deb B C, De S P, et al. Clinical and epidemiological studies on *Vibrio parahaemolyticus* infection in Calcutta (1975) [J]. *India J Med Res*,1976,64:576-580.
- [9] Abbott S L, Powers C, Kaysner C A, et al. Emergence of a reserected bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico [J]. *J Clin Microbiol*, 1998,27:2891-2893.

- [10] Yamasaki M, Meng D M, Pan J C, et al. Epidemiological study of outbreaks and sporadic cases due to *Vibrio parahaemolyticus*-serotype O3: K6 in Aichi Prefecture, Japan during 1998 and 2001 [J]. *Kansenshogaku Zasshi*, 2003, 77:1015-1023.
- [11] Hurley C C, Quirke A M, Reen F J, et al. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7:104-122.
- [12] WONG H C, LIU S H, WANG T K, et al. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 from Asia [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66:3981-3986.
- [13] ZHANG H Z, SUN S F, SHI W M, et al. Serotype, virulence and genetic traits of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Shanghai, China [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2013: Accepted.
- [14] 黄锐敏, 陈辉, 袁月明. 2004—2006年深圳南山区副溶血性弧菌菌群菌型分布及耐药分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2007, 17(7):1275-1335.
- [15] 张蔚, 潘劲草, 孟冬梅. 杭州地区 2000—2002年副溶血弧菌的分子分型研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(4):343-346.
- [16] Takahiro T. Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58:2679-2682.
- [17] 巢国祥. 副溶血性弧菌传播特征、O3: K6流行克隆分子生物学特性及多位点序列种群遗传研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.

调查研究

天津市市售贝类腹泻性贝类毒素的调查研究

马丹, 高丽娜, 李春青, 陈永平, 董学鹏

(农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心(天津), 天津 300221)

摘要:目的 对 2011 年 2 月—2012 年 1 月天津市售双壳经济贝类腹泻性贝毒(DSP)污染状况进行为期一年的抽样, 调查其食用安全性。方法 分别采用小鼠生物法和液相色谱-串联质谱法(LC/MS-MS)对可食部分进行检测, 测定毒素含量及分析毒素组成。结果 在所抽查的 10 种 103 个贝类样品中, 只有产自河北唐山的毛蚶中 5 月和 8 月采集的样品中有 2 个呈阳性且均超标。对阳性样品进行 LC/MS-MS 检测, 检出 DTX-1 和 YTX 毒素。结论 腹泻性贝毒在天津市场范围内检出率及含量整体水平不高, 但应提示有关部门应在春季预防, 在夏季加强对食用贝类的监测和宣传, 以保证市民健康安全。

关键词: 腹泻性毒素; 贝类; 小鼠生物法; 液相色谱-串联质谱法; 鳍藻毒素

中图分类号: R155.55 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)04-0366-04

Research on diarrhetic shellfish poisons of bivalves in seafood market of Tianjin

MA Dan, GAO Li-na, LI Chun-qing, CHEN Yong-ping, DONG Xue-peng

(Quality of Fishery Environment and Aquatic Products Supervision and Testing Center, Ministry of Agriculture, Tianjin 300221, China)

Abstract: Objective The diarrhetic shellfish poison (DSP) was investigated in shellfish samples collected from Feb 2011 to Jan 2012 in Tianjin seafood market. **Methods** Mouse bioassay and LC/MS-MS method were used to determine toxin content and its component. **Results** DSP was detected only in samples of *scapharca subcrenata* collected on May and august from TangShan, and both were over the limit. DTX-1 and YTX were confirmed in the positive samples by LC/MS-MS. **Conclusion** The overall DSP detection rate in shellfish from Tianjin market was low, but still essential to prevent the risk in spring and enhance monitoring and public education in summer.

Key words: Diarrhetic shellfish poison; shellfish; mouse bioassay; LC/MS-MS; DTX

腹泻性贝毒(Diarrhetic shellfish poisoning, DSP)是一种藻类毒素,被贝类滤食后其在贝类体内性质

非常稳定,一般烹调加热不能被破坏,人体食用后会产生以腹泻为主,伴有恶心、呕吐等中毒症状,故而命名。DSP 污染遍及世界,在英国^[1]、尼日利亚^[2]、日本^[3]、韩国^[4]等国均有检出。我国南北方贝类养殖基地,均已受到 DSP 的污染^[5-6]。DSP 按其结构可分为聚醚类毒素-大田软海绵酸(OA)及其

收稿日期:2013-05-10

基金项目:天津市水产局科研推广项目(2010-005)

作者简介:马丹 女 工程师 研究方向为水产品质量安全检测及海洋环境监测与评价 E-mail:md00000@gmail.com