

- [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

衍生物鳍藻毒素(DTXs)、大环聚醚内酯毒素-蛤毒素(PTXs)、融合聚醚毒素-虾夷扇贝毒素(YTXs)。目前检测 DSP 最普遍的方法是小白鼠生物法,但近年来国外已经对 LC-MS/MS 定性定量的 DSP 检测方法进行大量研究^[7-9],我国对此尚处于研究起步阶段,资料较少^[10-11]。LC-MS/MS 以得出结果更加省时、详细、准确的优点,逐渐成为全球先进检测实验室的必选方法。

天津市作为国内重要的沿海城市,是重要的水产品批发集散地,本文对天津市某水产品批发市场销售的双壳贝类 DSP 进行抽样检测,为贝类的安全性评价提供依据,同时为卫生监督部门提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品采集和处理

2011年2月—2012年1月,以月为周期,在天津市某水产品批发市场采购贝类样品,总共采集日常食用的贝类10种共103个样品,样品具体名称、产地及数量见表1。

表1 样品基本信息

Table 1 Information of samples

样品名称	产地	数量	样品名称	产地	数量
栉江珧	山东东营	12	青蛤	天津	12
波纹巴非蛤	山东荣成	12	文蛤	山东东营	12
虾夷扇贝	大连獐子岛	12	缢蛏	山东荣成	12
菲律宾蛤仔	辽宁丹东	12	库页岛厚蛤蜊	大连獐子岛	4
毛蚶	河北唐山	12	滑顶薄壳鸟蛤	山东青岛	3

1.1.2 主要仪器与试剂

ACCELA-TSQ QUANTUM ACCESS 高效液相色谱-串联质谱仪、旋转蒸发器、均质机、台式离心机、Organomation Associates. Inc N-EVAPTM112 氮吹仪。

丙酮、乙醚、甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵、氨水,所用试剂均为分析纯或色谱纯,试验用水为高纯水,大田软海绵酸(OA)、鳍藻毒素-1(DTX-1)、蛤毒素-2(PTX-2)、虾夷扇贝毒素 YTX 标准品(均由黄海水产研究所提供)。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

每个样品采样量为 3 kg/次,以保证满足两种毒素检测试验的需要量,采样完成后 1 h 内低温保存送至样品前处理室,以清水冲洗贝类样品外壳,待去除表面泥沙等附着物后,再用解剖刀将其软组织与壳分离,搅碎后将待检样品装于高密度食品级塑料袋中,抽真空密封,立即放入 -20℃ 冰箱冻存备用。另外,样品前处理时虾夷扇贝、栉江珧样品的消化腺与贝肉分离,单独保存。

1.2.2 小鼠生物法

按照 GB/T 5009.212—2008^[12] 贝类中腹泻性贝类毒素的测定方法对所有贝类样品进行提取和检测。

试验所用小鼠为 ICR 雄性 SPF 级,体重 18 ~ 20 g,全部购自于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心[许可证号 SCXK-(军)2007-004]。

1.2.3 液相色谱-串联质谱法

提取:称 2 g 样品于 15 ml 具塞离心管中,加 5 ml 甲醇涡旋 1 min,超声提取 5 min 后以 4 000 r/min(离心半径 6.5 cm)离心 5 min,取上清液于 10 ml 刻度玻璃离心管中,残渣重复提取 1 次,合并提取液,于 40℃ 氮气吹至约 1 ml,加 3 ml 水涡旋混匀,超声 1 min;

净化:将提取液透过经 1 ml 甲醇和 1 ml 30% 甲醇水活化的 StrataTM-X 固相萃取柱(60 mg, 3 ml),先后再用 1 ml 20% 甲醇水、1 ml 0.3% 氨水甲醇溶液洗脱,收集滤液以甲醇定容至 1 ml,过 0.22 μm 滤膜后等待上机。

1.2.4 仪器条件

色谱条件: Hypersil GOLD 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm),流动相 A 为含 50 mmol/L 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵的水溶液, B 为含 50 mmol/L 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵的 95% 乙腈溶液,梯度洗脱,流速 0.20 ml/min,进样量 10 μl,柱温 30℃。

质谱条件:电离方式为电喷雾离子源,ESI 正负切换,喷雾电压 3 500 V,离子传输管温度 350℃,鞘气压力 720 L/h,辅助气压力 120 L/h。

1.2.5 灵敏度

检出限: PTXs 为 1.0 μg/kg, OA、DTX-1、YTX 均为 2.0 μg/kg。定量限: PTXs 为 2.0 μg/kg, OA、DTX-1、YTX 均为 5.0 μg/kg。

2 结果

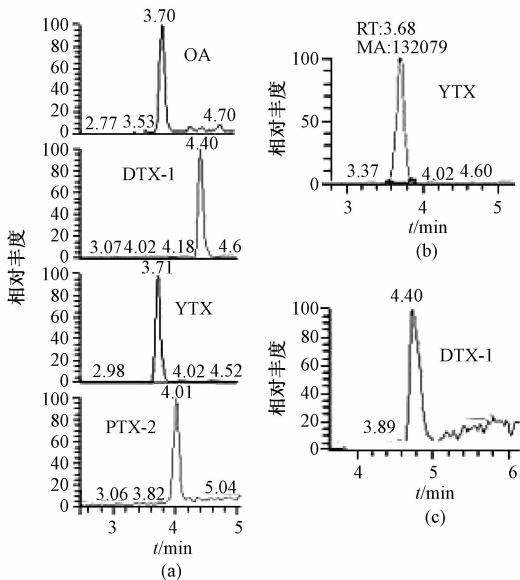
2.1 小白鼠生物法^[12]

在所采集的 10 种日常食用贝类样品中,产自河北唐山的毛蚶检出阳性,其余 9 种贝类的检测结果均为阴性。全年样品中虾夷扇贝、栉江珧的消化腺均已去除,仅取可食部分进行检测,在全部 103 个样品中,有 2 个染毒样品,分别出现在 2011 年 5 月和 8 月所采样品中,结果均为 0.05 Mu/g,与我国目前暂定的腹泻性贝毒警戒标准相同^[13],说明阳性样品均超标。

2.2 液相色谱-串联质谱法

对虾夷扇贝消化腺及阳性结果中 5 月份采集的毛蚶进行液相色谱-串联质谱分析(见图 1),共测定 4 种腹泻性贝毒,分别为 OA、DTX-1、PTX-2 和 YTX。

以加标空白各贝类毒素定量离子的质量色谱峰面积为纵坐标,质量浓度(ng/ml)为横坐标绘制标准曲线,检出限及回收率见表2。



注: a为空白加标; b为虾夷扇贝消化腺; c为2011年5月采集的毛蚶。

图1 样品液相色谱-串联质谱图

Figure 1 Chromatograms of samples

表2 方法对四种毒素检测线性方程、检出限及回收率

Table2 Linearity, LOD and recoveries of LC/MS-MS method

毒素名称	标准曲线	相关系数	检出限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%
OA	$y = 2234.12x - 11697.8$	$r = 0.9990$	2.0	87.8
DTX-1	$y = 4499.88x - 14474.1$	$r = 0.9995$	2.0	83.4
PTX-2	$y = 5927.44x + 8835.15$	$r = 0.9965$	1.0	91.3
YTX	$y = 152.938x - 375.97$	$r = 0.9993$	2.0	93.7

试验曾分别用 StrataTM-X 和 Oasis HLB 两种固相柱萃取毒素,但回收率显示后者不能达到满意度,尤其是对 YTX 和 OA,甚至无法半量回收,所以弃去其检测数据。结果显示,在虾夷扇贝消化腺样品中仅测得 YTX 阳性,含量为 $65.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。2011年5月采集的毛蚶样品中仅 DTX-1 阳性,含量为 $126.2 \mu\text{g}/\text{kg}$,其他毒素均未检出。

3 讨论

小鼠生物测定法^[12]是检测贝类组织中 DSP 最常用的方法,是 AOAC(美国官方化学师协会)标准方法,在国内外普遍使用。在所采集的 10 种日常食用贝类样品中,仅产自河北唐山的毛蚶检测出腹泻性贝类毒素,占采样种数的 10%;共有 2 例呈 DSP 阳性,占该种样品的 17%;在全部 103 个样品中,样品检出率为 2%,并且均超标。染毒样品出现在 5 月和 8 月采集的毛蚶,由于 5 月份采样在月末,故夏季为全年贝类染毒的高峰期。

小鼠生物测定法固然普遍且简单易行,但缺乏

特异性,液相色谱-串联质谱测定法灵敏度高、特异性强、既能定性又能定量。由于 DSP 毒素种类繁多,毒性各异,所以对于阳性样品采用液相色谱-串联质谱法进一步确认毒素的组分及含量。阳性毛蚶样品仅检出 4 种毒素中的 DTX-1,也与郑重莺^[14]所检测的结果相同。目前对于 DSP 已经分离出 23 种成分,由于标准品种类所限,很多成分并不能进行定性定量分析,是导致检测结果换算成鼠单位的结果小于 $0.05 \text{ Mu}/\text{g}$ 的原因。还有一些北方海域贝类 DSP 调查显示 OA 的染毒率较高^[15],但本次抽样调查中并没有检测出 OA,这也说明河北唐山的毛蚶养殖基地没有被产 OA 的有毒藻类大规模污染,但由于赤潮频发、水体交换等海洋现象不断变化,也应时刻加大对环境及产品的实时监测。YTXs 多存在于扇贝中,由于制样腺肉分离保存,所以直接对虾夷扇贝的消化腺进行上机检测,结果显示 YTXs 呈阳性,但含量不高。

OA、DTXs 能引起肠胃炎等急性症状,通过抑制蛋白磷酸酶的活性,促进肿瘤形成,加速癌变,并且可以使调节免疫系统的白细胞介素受到抑制,产生突变和免疫毒素,具有潜在的致病性;对小鼠腹腔注射 PTXs,其肝细胞最终充满空泡和颗粒,诱导肝细胞快速坏死;YTXs 可导致小鼠心肌细胞肿胀,甚至微小脂肪滴沉积。这些动物试验都说明 DSP 不仅能引发急性腹泻,还能诱发是多种疾病。因此夏季食用贝类,应将消化腺剔除,操作时切勿破坏腺体,防止毒素污染可食部分。本次调查研究时间跨度较短,抽样贝类种类、数量有限,作为市售贝类 DSP 成分及含量调查的数据积累,希望有关部门关注并加强监测力度。

参考文献

- [1] Keith D, Eileen B. Shellfish toxicity in UK waters: a threat to human health? [J]. Environmental Health, 2009, 8(1): S12.
- [2] Okechukwu O, Igboeli, Alsaac U A. 'Diarrhetic' Type Shellfish Poisoning in Nigeria [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2010, 84(1): 15-18.
- [3] Toshiyuki S, Taketo J, Yuri S, et al. Quantification of lipophilic toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in Japanese bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry and comparison with mouse bioassay [J]. Fisheries Science, 2005, 71(6): 1370-1378.
- [4] Ji H K, Toshiyuki S, Kajeong L, et al. The first detection of okadaic acid and its derivatives in Korean bivalves by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Fisheries Science, 2008, 74(2): 433-438.
- [5] 徐志斌, 吴施卫, 陈凯彪, 等. 广东省近岸海域贝类腹泻性毒素含量与胃含物的分析 [J]. 海洋通报, 2010, 29(4): 444-449.

- [6] 刘宁,潘国伟,李春盛,等. 辽东湾赤潮污染海区贝类软海绵酸的染毒情况调查分析[J]. 中国公共卫生,1999,15(3):209-210.
- [7] AnjaNJA T, Christine K, Ingo N, et al. Results of a European interlaboratory method validation study for the quantitative determination of lipophilic marine biotoxins in raw and cooked shellfish based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part I: collaborative study [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399 (3): 1245-1256.
- [8] Arjen G, Patrick P J M, Mairead A M, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions [J]. Journal of Chromatogr A,2009,1216(9):1421-1430.
- [9] Arjen G, Mairead A M, Patrick P J M, et al. Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2009,394(4):1213-1226.
- [10] 黄聪,李晓晶,彭荣飞,等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测贝类产品7种脂溶性贝类毒素[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(5):1075-1077.
- [11] 母清林,方杰,万汉兴,等. 液相色谱-串联质谱法检测贝类产品中腹泻性贝类毒素[J]. 分析化学,2011,39(1):111-114.
- [12] 中国标准化工作委员会. GB/T 5009. 213—2008 贝类中麻痹性贝类毒素的测定[S]. 北京:中国标准出版社,1999.
- [13] 中国标准化工作委员会. SN 0294—93 出口贝类腹泻性贝类毒素检验方法[S]. 北京:中国标准出版社,1993.
- [14] 郑重莺,张海琪,宋琍琍,等. 浙江省市售主要食用贝类中麻痹性贝类毒素和腹泻性贝类毒素污染状况分析[J]. 浙江农业科学,2012(2):236-239.
- [15] 李春盛,刘宁,陆守政,等. 辽宁省市售贝类中肠腺中软海绵酸染毒情况调查[J]. 中国公共卫生,1999,15(12):1150-1151.

调查研究

宁波地区食品中致病菌污染物检测与调查

盛冬萍¹, 谢益君¹, 陈米娜¹, 徐景野²

(1. 宁波市镇海区疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315200;

2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315010)

摘要:目的 了解宁波地区食品中携带或污染的致病菌,为控制食源性疾病提供依据。方法 致病菌检测采用直接分离与增菌分离相结合的方法;细菌鉴定采用生化筛检和 API 等方法;血清分型采用诊断血清凝集法;药敏试验采用 K-B 法;采用 PCR 检测耐药基因。结果 从 6 812 份食品标本中检出致病菌 7 类 12 种,共 2 331 株,检出率为 34.22%,以副溶血性弧菌检出率最高,与其他病原菌检出率比较差异有统计学意义($P < 0.005$)。主要流行株副溶血性弧菌分型发现 10 个血清群, O:6 群和 O:5 群为优势群。检出的致病菌对大多数抗生素敏感,其中 3 株气单胞菌为带 aacc 耐药基因的多重耐药菌。结论 宁波地区食品中致病菌构成复杂,食品污染是引起食源性疾病的主要原因,其中副溶血性弧菌是最主要的流行菌株;检出的致病菌对多种抗生素敏感,存在 aacc 耐药菌应引起关注,控制的关键是采取合理用药,加强对耐药菌株的监测,以减少耐药菌的传播和扩散。

关键词:食品;食源性致病菌;检测鉴定;血清分型;耐药性

中图分类号:R155.3;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)04-0369-06

Detection and investigation of foodborne bacterial pathogens in Ningbo

SHENG Dong-ping, XIE Yi-jun, CHEN Mi-na, XU Jing-ye

(Zhenhai Centre for Disease Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315200, China)

Abstract: Objective objective To understand the presence, contamination and cross contamination of foodborne bacterial pathogens in Ningbo city, provide basis for foodborne disease control, and trace the source of foodborne disease.

Methods Strains were detected directly or after enrichment with biochemistry and API method, and subtyped with serum agglutination method. Antibiotic resistance and relative genes were detected with K-B method and PCR method respectively. **Results** 2 331 (7 species and 12 types) strains were detected from 6 812 food samples and the detection

收稿日期:2013-05-27

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2009A610121);创新团队项目(2012BB2018)

作者简介:盛冬萍 女 副主任技师 研究方向为微生物检验和质量控制 E-mail:sdpone@163.com

通讯作者:徐景野 男 主任技师 研究方向为微生物检验 E-mail:xujy@nbcdc.org.cn