

## 调查研究

## 北京市市售带壳牡蛎致病性弧菌污染状况调查

严寒秋<sup>1</sup>, 曲梅<sup>1</sup>, 高志勇<sup>1</sup>, 逢波<sup>2</sup>, 刘白薇<sup>1</sup>, 霍达<sup>1</sup>, 杜轶威<sup>1</sup>, 王全意<sup>1</sup>

(1. 北京市疾病预防控制中心 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013;

2. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206)

**摘要:**目的 了解北京市市售带壳牡蛎致病性弧菌污染状况。方法 2014年2~11月每月在某水产品批发市场的摊位抽样200只带壳牡蛎,共80份样品(其中腮和肠样品分别为40份)。用常规培养方法检测牡蛎腮和肠(含便)中致病性弧菌,对副溶血性弧菌进行血清学分型,荧光定量PCR检测副溶血性弧菌毒力基因 $tdh$ 、 $trh$ 和 $tlh$ 。结果 80份牡蛎样品中,致病性弧菌阳性样品检出率为62.50%(50/80),副溶血性弧菌阳性菌株检出率为33.75%(27/80),溶藻弧菌阳性菌株检出率为31.25%(25/80);各牡蛎腮和肠样品中,致病性弧菌阳性检出率为67.50%(27/40)和57.50%(23/40);27株副溶血性弧菌共9种血清型;毒力基因检测结果表明, $tlh$ 均为阳性, $tdh$ 和 $trh$ 均为阴性。结论 北京市市售带壳牡蛎中致病性弧菌污染严重,以副溶血性弧菌和溶藻弧菌检出为主。

**关键词:**牡蛎;腮;肠;致病性弧菌;血清型;毒力基因;食源性致病菌;食品安全

中图分类号:R155;R378.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)06-0646-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.06.010

Investigation of pathogenic *Vibrios* contamination status in oyster in Beijing

YAN Han-qiu, QU Mei, GAO Zhi-yong, PAN Bo, LIU Bai-wei, HUO Da, DU Yi-wei, WANG Quan-yi

(Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

**Abstract: Objective** To investigate the contamination of pathogenic *Vibrios* in oyster in Beijing markets. **Methods** Two hundreds of samples were obtained from 80 batches marine products in a wholesale market in Beijing from February to November in 2014. Routine methods were used to detect pathogenic *Vibrios* in the gills and intestines of oysters. *Vibrios parahaemolyticus* isolates were serotyped.  $tdh$ ,  $trh$  and  $tlh$  genes were detected with real time PCR. **Results** The isolation rates of pathogenic *Vibrios*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* were 62.50%, 33.75% and 31.25% respectively. The isolation rates of pathogenic *Vibrio* were 67.50% and 57.50% in gill and intestine samples respectively. Nine serotypes were identified in the isolated *Vibrio parahaemolyticus*.  $tdh$  and  $trh$  gene were negative while  $trh$  gene was positive in all 27 *Vibrio parahaemolyticus*. **Conclusion** A large proportion of oyster sold in market were contaminated by pathogenic *Vibrios* and *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* were the predominant species. Oyster without gills and intestine were safer to consume.

**Key words:** Oyster; gills; intestine; pathogenic *Vibrios*; serotype; virulence gene; foodborne pathogens; food safety

牡蛎宜生长在高盐的海水中。弧菌科中对人类致病的副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*, VA)、河流弧菌(*Vibrio fluvialis*, VF)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, VV)、麦氏弧菌(*Vibrio metschnikovii*, VM)、气单胞菌(*Aeromonas*, AM)等是嗜盐性细菌,广泛分布于海水

及海产品中<sup>[1]</sup>。若直接或间接食用被上述致病性弧菌污染的食品与水源可引起急性胃肠炎,甚至败血症<sup>[2]</sup>。贝类牡蛎的生长嗜盐性和致病性弧菌嗜盐性使双方极易互生共存,提高了食用此类食物的人患急性胃肠炎的风险。为了解北京市市售带壳牡蛎致病性弧菌污染状况,2014年2~11月每月对某大型水产品批发市场的摊位抽样,检测牡蛎的腮和肠,并对检出的VP菌株进行血清学分型和毒力基因检测。最终通过对试验数据的分析,以期能引导消费者科学进食牡蛎,为疾病防治和食品安全卫生监督提供科学依据。

收稿日期:2015-03-04

基金项目:北京市自然科学基金项目(7132045)

作者简介:严寒秋 女 主任技师 研究方向为病原微生物检验

E-mail:hqyan907@sina.com

通讯作者:王全意 男 研究员 研究方向为传染病防治及食品安全

E-mail:bjedexm@126.com

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品与菌株

2014年2月~11月每月不定期在北京市某大型水产品批发市场的固定摊位采集样品,每个摊位一次采5只牡蛎,样品呈鲜活状,共200只。样品采集后立即送检。VP对照菌株(O6:K18、tdh+、trh+和tlh+)为北京市疾病预防控制中心保存。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

VITEK 60全自动微生物鉴定系统(法国生物梅里埃)、ABI7500荧光定量PCR仪(美国ABI)。

3% NaCl碱性蛋白胨水(北京陆桥公司),硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(TCBS,美国BD),0.5%去氧胆酸钠水溶液(北京友康公司),氧化酶试剂、GN鉴定卡均购自法国生物梅里埃,2×PCR反应预混液(RR390A,大连宝生物公司),VP诊断血清(日本Denka-Seiken)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品处理

为提高致病性弧菌的检出率,将每个摊位一次所采的5只牡蛎定为一组,共40组。每组分别用无菌剪子和镊子去壳取腮和肠(含便),且腮和肠分别放置无菌平皿中,每组的腮和肠各为1份,共80份。将每组的腮和肠用无菌剪子剪碎并混匀备用。

#### 1.2.2 增菌与分离培养

用2支无菌棉签多处蘸取按照1.2.1部分处理后的样品,放入3% NaCl碱性蛋白胨水中37℃增菌,过夜培养后用接种环沾取一环接种TCBS平板,37℃培养18h。

#### 1.2.3 致病性弧菌生化鉴定

在TCBS平板挑取绿色或黄色的单个菌落于3% NaCl溶菌肉汤固态培养基(LB)平板,37℃培养18h。挑取纯培养菌苔进行氧化酶和黏丝试验。氧化酶阳性或氧化酶阴性黏丝试验阳性的菌使用VITEK GN鉴定卡进行致病性弧菌生化鉴定。生化结果可信度≥85%且符合霍乱防治手册<sup>[3]</sup>中致病性弧菌生化特点的菌株可判定为致病性弧菌。

#### 1.2.4 VP的血清学分型鉴定

生化鉴定为VP的菌株使用VP诊断血清进行血清学分型,O分型血清(O1~O11)11种,K分型血清(K1~K71)65种。试验操作参照文献<sup>[4]</sup>进行。K抗原不可分型计为KUT(untypable,UT)。

#### 1.2.5 荧光定量PCR检测VP毒力基因

##### 1.2.5.1 模板制备

把VP血清学分型鉴定后的菌株接种到3% NaCl LB平板,37℃培养18h。挑取LB平板上VP

的单菌落于160 μl焦碳酸二乙酯(DEPC)水中,100℃加热10 min,8 000×g离心10 min,吸取上清130 μl,-20℃保存备用。

##### 1.2.5.2 荧光定量PCR试验<sup>[5]</sup>

用荧光定量PCR检测与VP致病性有关的毒力基因:耐热直接溶血素(tdh)基因、耐热相关溶血素(trh)基因和不耐热溶血素(tlh)基因。

引物和探针具体序列:tdh-F:AATGTTGACATCCTACATGACTG,tdh-R:TTTACGAACACAGCAGAA TGACC,tdh-P:FAM-TATAGCCAGACACCGCTGCCA TTGTATAGTTAMRA;trh-F:GATTGCGTTAACTGGTGAT TCAG,trh-R:GCGATTGATCTACCATCCATACC,trh-P:FAM-TTCCTTCTCCAGGTTCCGATGAGCTACTTAMRA,tlh-F:TGTGGTTGTATGAGAAGCGATTG,tlh-R:ACGT TATCCGTCAGCGTTGTG,tlh-P:FAM-TGTCTGCCGTTCT CGTTCGCCAAATCTTAMRA。

反应体系(20 μl):2×PCR反应混合物10 μl,上下游引物(10 μmol/L)各0.4 μl,TaqMan探针(10 μmol/L)0.4 μl,模板DNA 2 μl,去离子水6.8 μl。循环条件:95℃预变性30 s循环1次,95℃变性5 s和60℃退火、延伸34 s循环40次,在退火阶段检测荧光,Ct值≤35且有典型的S形曲线判为阳性,否则阴性。每次试验用对照菌株VP(O6:K18)做阳性对照,用DEPC水做空白对照。

## 2 结果

### 2.1 市售带壳牡蛎致病性弧菌阳性检出率情况

80份样品检出6种致病性弧菌共68株,检出致病性弧菌样品阳性共50份,阳性检出率为62.50%(50/80);其中VP 27株,阳性检出率为31.25%(25/80);VA检出25株,阳性检出率为31.25%(25/80);VF和VV各3株、VM 2株、AM 8株,阳性检出率依次为3.75%(3/80)、3.75%(3/80)、2.50%(2/80)、10.00%(8/80),见表1。

### 2.2 牡蛎腮和肠致病性弧菌阳性检出率状况

80份样品中,检出致病性弧菌样品50份,阳性检出率62.50%(50/80);各40份牡蛎腮和肠样品中,检出致病性弧菌样品分别为27和23份,阳性检出率为67.50%(27/40)和57.50%(23/40);部分腮和肠样品中同时检出多种致病性弧菌,见表2。

### 2.3 副溶血性弧菌血清型分布和毒力基因检测结果

对27株VP菌株进行血清学分型:共9种血清型,O型7种,K型3种;KUT共24株,其中O3:KUT 9株,O4:KUT 6株,O1:K33 2株,O1:KUT 2株,O5:KUT 1株,O10:KUT 4株,O5:K30、O8:KUT和O11:KUT各1株。

表1 市售带壳牡蛎致病性弧菌阳性检出情况

Table 1 Isolation rate of different pathogenic *Vibrios* in oysters from wholesale market

| 样品类型  | 样品数/份 | VP  |                       | VA  |                       | VF  |                       | VV  |                       | VM  |                       | AM  |                       |
|-------|-------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|-----|-----------------------|
|       |       | 菌株数 | 阳性样品数/份<br>/株 (检出率/%) |
| 腮     | 40    | 15  | 13(32.50)             | 13  | 13(32.5)              | 3   | 3(7.50)               | 0   | 0(0.00)               | 1   | 1(2.50)               | 6   | 6(15.00)              |
| 肠(含便) | 40    | 12  | 12(30.00)             | 12  | 12(30.00)             | 0   | 0(0.00)               | 3   | 3(7.50)               | 1   | 1(2.50)               | 2   | 2(5.00)               |
| 合计    | 80    | 27  | 25(31.25)             | 25  | 25(31.25)             | 3   | 3(3.75)               | 3   | 3(3.75)               | 2   | 2(2.50)               | 8   | 8(10.00)              |

表2 市售带壳牡蛎致病性弧菌污染情况(份)

Table 2 Distribution of different pathogenic *Vibrios* in 50 batches of oysters from wholesale market

| 样品类型  | 阳性样品数 | 被1种致病性弧菌污染样品数 |    |    |    |    |    | 被2种致病性弧菌污染样品数  |       |       |       |       | 被3种致病性弧菌污染样品数 |
|-------|-------|---------------|----|----|----|----|----|----------------|-------|-------|-------|-------|---------------|
|       |       | VP            | VA | VF | VM | VV | AM | VP+VA          | VP+VF | VP+AM | VA+VV | VA+AM | VP+VA+AM      |
| 腮     | 27    | 5             | 7  | 2  | 1  | 0  | 4  | 5 <sup>a</sup> | 1     | 1     | 0     | 0     | 1             |
| 肠(含便) | 23    | 7             | 5  | 0  | 1  | 2  | 1  | 5              | 0     | 0     | 1     | 1     | 0             |
| 合计    | 50    | 12            | 12 | 2  | 2  | 2  | 5  | 10             | 1     | 1     | 1     | 1     | 1             |

注:a表示有一份腮样品同时检出3株不同血清型VP

27株VP菌株毒力基因结果为*tlh*均为阳性,*tdh*和*trh*均为阴性。

### 3 讨论

急性胃肠炎主要是由病毒和细菌引起的以腹泻为主要临床特征的一组肠道传染病,虽然病毒引起的急性胃肠炎近几年呈上升趋势<sup>[6-8]</sup>,但细菌特别是致病性弧菌引起急性胃肠炎依旧是一个不容忽视的问题<sup>[9]</sup>。随着经济的发展,人们的生活质量日益提高,大量食用海产品已是普遍现象,北京市尤为突出。因牡蛎等海产品和致病性弧菌存在共生性<sup>[10]</sup>,对北京市市售带壳牡蛎致病性弧菌污染状况进行调查是非常必要的。

人们食用牡蛎时为保障鲜嫩的口感,更喜好快速水焯、涮或烤等快捷的烹饪方法。本研究中的80份市售带壳牡蛎50份样品检出致病性弧菌,阳性检出率62.50%;50份阳性样品中检出6种致病性弧菌,且15份样品检出2种以上致病性弧菌,结果表明致病性弧菌严重污染了市售带壳牡蛎。而快捷食用方法能否杀灭致病菌值得商榷,因此应在加工过程中选择100℃高温灭菌,降低食用牡蛎患急性胃肠炎的风险。另一方面市民提高自身食品安全意识,也会减少食用生鲜牡蛎的机会。同时疾病预防控制中心和食品安全监督部门应加强对餐馆的食品监督,特别是夜市和大排档更是监督的重点,为市民提供一个良好的就餐大环境来降低食用牡蛎患急性胃肠炎的风险。

腮部是牡蛎的滤食器官,滤水量可达5~25 L/h,牡蛎腮对病原微生物具有较强的富集作用<sup>[11]</sup>,所以本研究同时对牡蛎腮和肠(含便)样品进行检测,阳性检出率为67.50%和57.50%;牡蛎肠(含便)样品中检出了1种或同时检出了2种致病性弧菌,而牡

蛎腮样品中还同时检出了3种致病性弧菌。研究表明腮比肠携带致病菌数量及种类更多,建议加工牡蛎时同时去除腮和肠,使牡蛎的食用安全得以进一步保障。

在研究中,80份样品检出VP 27株、VA 25株、VM 2株、AM 8株、VF和VV各3株,这表明VP和VA是牡蛎污染的主要致病性弧菌。VP和VA都是可引起急性胃肠炎的致病性弧菌<sup>[2]</sup>,而截止到2013年,我国食品安全国家标准中针对致病性弧菌的检验只有VP<sup>[4]</sup>,建议增加食品安全检验VA的国家标准,规范食品中VA的检测方法。

自2007年起国内外相继报道了VP国际大流行株血清型及变种<sup>[12-14]</sup>,在本次调查中未检出O3:K6大流行株血清型,但检出了变种株(O3:KUT、O4:KUT、O1:K33、O1:KUT和O5:KUT)20株;曲梅等<sup>[5]</sup>报道的北京市人源VP检出的大流行株血清型O3:K6,变种O1:K25、O2:K3、O3:K5、O4:K4、O4:K8、O4:K68、O3:KUT和O4:KUT,在两次不同年份的研究中均检出变种O3:KUT和O4:KUT,这表明人源和食源菌株有某种程度的一致性。2014年陈洪友等<sup>[14]</sup>对国内的VP菌从血清型、毒力基因、基因序列的分析(GS-PCR)等多方面研究鉴别流行株与毒力基因的关系,与之相比本研究尚有不足,有待于应用国际公认的方法GS-PCR对北京地区VP菌株进行深入研究。本次研究中的另一缺憾是因受采样数量和采样时间所限对不同季节牡蛎样品的污染情况未做深入探究。

调查采样中发现,市售带壳牡蛎均为我国南北沿海地方养殖生产的,水产品批发市场内人员混杂,销售人员食品安全意识淡薄,市场环境较差,这为牡蛎等水产品的病原菌滋生提供了良好的条件,同时各类水产品极易发生交叉污染。建

议食品安全管理部门对水产品物流中批发环节高度重视严格监管,治理市场环境,加强对销售人员食品安全意识的培训,把好“病从口入”这一关。

## 参考文献

- [1] 王秀茹. 预防医学微生物学及检验技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:337-356.
- [2] 聂青和. 感染性腹泻病[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:365-459.
- [3] 肖东楼. 霍乱防治手册 6 版[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:91-92.
- [4] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 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]. 北京:中国标准出版社,2013.
- [5] 曲梅,张新,刘桂荣,等. 北京市副溶血性弧菌病原学和分子流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志,2011,32(12):1255-1258.
- [6] 张海龙,李苑,姚相杰,等. 2010—2011 年深圳市宝安区诺如病毒的分子特征分析[J]. 国际病毒学杂志,2013,20(3):118-122.
- [7] 张海龙,李苑,赵德坚,等. 深圳市腹泻患者肠道腺病毒感染的分

- 子流行病学特征[J]. 国际病毒学杂志,2014,21(2):71-75.
- [8] 严寒秋,李伟红,高志勇,等. 2011 年北京地区婴幼儿病毒性腹泻病原学研究[J]. 中国病原生物学杂志,2014,9(10):919-921.
- [9] 黄芳,邓瑛,曲梅,等. 2010 年北京市感染性腹泻病原学监测分析[J]. 中华预防医学杂志,2011,45(9):820-824.
- [10] 黄亮,蔡俊鹏,陈小红,等. 应用蛭弧菌清除牡蛎中潜在致病弧菌的研究[J]. 现代食品科技,2010,26(3):225-230.
- [11] 陈洪友,屠丽红,陈敏,等. 贝类水产中副溶血性弧菌菌型分布研究[J]. 疾病监测,2014,29(7):522-527.
- [12] Naic G B, Ramamurthy T, Bhattacharya S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants[J]. Clin Microbiol Rev,2007,20(1):39-48.
- [13] Serichantalergs O, Bhuiyan N A, Nair G B, et al. The dominance of pandemic serovars of *Vibrio parahaemolyticus* in expatriates and sporadic cases of diarrhoea in Thailand, and a new emergent serovars (O3:K46) with traits[J]. J Med Microbiology,2007,56(5):608-613.
- [14] 陈洪友,盛跃颖,宋元君,等. 上海地区副溶血性弧菌大流行菌株及分子特征研究[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(1):5-9.

## 调查研究

# 原料淀粉中铝残留量的调查分析

解魁<sup>1</sup>,张正尧<sup>2</sup>,张丁<sup>1</sup>,付鹏钰<sup>1</sup>,李永利<sup>1</sup>

(1. 河南省疾病预防控制中心,河南 郑州 450016; 2. 周口市疾病预防控制中心,河南 周口 466000)

**摘要:**目的 了解我国原料淀粉中铝含量,为制定和完善淀粉制品的铝限量标准提供科学依据。方法 随机抽取 6 类 229 份原料淀粉样品,按 GB/T 5009.182—2003《面制食品中铝的测定》处理样品,检测铝含量并进行分析。结果 原料淀粉中铝含量范围为 ND~190.43 mg/kg,中位数为 18.14 mg/kg,平均含量达到 36.04 mg/kg,多数处于较低水平。不同种类的原料淀粉中铝含量差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中甘薯淀粉中的铝含量远高于其他原料淀粉,其含量平均值达到 69.52 mg/kg,其中最大值为 190.43 mg/kg。结论 甘薯是富铝作物,建议加强对甘薯类淀粉制品的特殊监管。本研究初步了解了 6 类原料淀粉中的铝残留量,为制定和完善铝本底含量值标准提供依据。

**关键词:**铝;原料淀粉;残留量;甘薯;食品安全;违法添加;食品添加剂

中图分类号:R155;O614 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)06-0649-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.06.011

## Investigation and analysis of aluminum content in raw starch

XIE Kui, ZHANG Zheng-yao, ZHANG Ding, FU Peng-yu, LI Yong-li

(Henan Center for Disease Control and Prevention, Henan Zhengzhou 450016, China)

**Abstract: Objective** The background value of aluminum in raw starch was investigated to provide the basis for formulating and improving relevant standards of starch products. **Methods** Six types of 229 raw starch were collected randomly, and aluminum was analyzed according to the national standard GB/T 5009.182-2003. **Results** The concentration of aluminum ranged in ND-190.43 mg/kg, most of which were low. The median value was 18.14 mg/kg and