

风险监测

2016年北京市海产品中创伤弧菌的污染调查及两种检测方法比较

王紫薇¹, 汪琦¹, 赵晓娟¹, 韩笑¹, 刘莉¹, 魏咏新¹, 陈鑫¹, 杨丽莉¹, 曹嘉悦¹, 徐蕾蕊¹,
吕敬章², 曾静¹

(1. 北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026;

2. 深圳出入境检验检疫局食品中心, 广东 深圳 518045)

摘要:目的 对北京市市售海产品的创伤弧菌污染情况进行调查, 并比较实时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)方法与VITEK鉴定方法检测结果的一致性。方法 采用传统检验方法结合分子生物学方法对在北京市市场随机采集的105份海产品进行创伤弧菌检验, 并比较了RT-PCR法和VITEK鉴定方法的准确性。结果 105份海产品中, 有40份样品检出创伤弧菌, 检出率为38.10%; 其中, 虾类产品检出率高达52.38%(11/21), 其次为贝类产品(37.88%, 25/66)和鱼类产品(22.22%, 4/18)。经*rpoB*基因测序验证, RT-PCR和VITEK方法的准确率分别为100.00%(40/40)和67.50%(27/40)。结论 北京市海产品中存在创伤弧菌的污染, 应对海产品中创伤弧菌引起食源性污染的潜在风险进行评估, 预防食物中毒的发生。

关键词:创伤弧菌; 海产品; 污染; 调查; 方法比较; 食源性致病菌; 实时荧光聚合酶链式反应; VITEK鉴定; 北京
中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2018)02-0182-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.02.012

Investigation on *Vibrio vulnificus* contamination of seafood in Beijing in 2016 and detection methods comparison

WANG Zi-wei¹, WANG Qi¹, ZHAO Xiao-juan¹, HAN Xiao¹, LIU Li¹,
WEI Yong-xin¹, CHEN Xin¹, YANG Li-li¹, CAO Jia-yue¹, XU Lei-rui¹,
LYU Jing-zhang², ZENG Jing¹

(1. Beijing Inspection Quarantine Testing Center, Beijing 100026, China;

2. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Shenzhen 518045, China)

Abstract: Objective To investigate *Vibrio vulnificus* contamination in seafood in Beijing region and compare the results between real time fluorescence chain reaction (RT-PCR) and VITEK. **Methods** 105 samples of seafood were randomly collected from Beijing region and were detected by traditional method combined with molecular biology method. Comparison of accuracy between RT-PCR and VITEK identification method was also conducted. **Results** Among 105 seafood samples, there were 40 *Vibrio vulnificus* positive samples, and the positive ratio was 38.10%. The positive ratio for shrimp, shellfish and fish were 52.38% (11/21), 37.88% (25/66) and 22.22% (4/18), respectively. Confirmed by *rpoB* gene sequencing, the accuracy was 100.00% (40/40) for RT-PCR, and 67.50% (27/40) for VITEK. **Conclusion** *Vibrio vulnificus* contamination in seafood was an existing problem in Beijing region. In order to prevent the occurrence of food safety events, an evaluation of the potential risk of *Vibrio vulnificus* contamination in seafood was in need.

Key words: *Vibrio vulnificus*; seafood; contaminant; investigate; comparison methods; foodborne pathogenic bacteria; real time fluorescence polymerase chain reaction; VITEK identification; Beijing

收稿日期: 2017-12-08

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0401102); 国家质检总局科技计划(2016IK019); 国家质检总局科技计划(2017IK145)

作者简介: 王紫薇 女 工程师 研究方向为食品微生物
E-mail: 824574760@qq.com

通信作者: 曾静 女 研究员 研究方向为食品微生物
E-mail: zengj@bjciq.gov.cn

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)为革兰阴性菌, 是嗜碱嗜盐型非霍乱海洋弧菌, 广泛存在于亚热带海洋环境及海产品中^[1], 当海水温度持续2周以上超过20℃时, 创伤弧菌会大量繁殖^[2]。创伤弧菌是引起人兽共患病的病原菌^[3], 通常人们通过食用受创伤弧菌污染的海产品或水源, 或是因为创口接触了带菌的海水或海洋动物从而感染上创伤弧菌^[4]。受到该菌感染后的临床表现主要有原发性败血症、

软组织感染及急性胃肠炎三大症状^[5],少数发生自发性腹膜炎和肺炎。原卫生部于2006年将创伤弧菌列入危害程度第三类病原微生物^[6]。国内外有关创伤弧菌的存在和感染事件屡见报道^[7-12]。

美国、加拿大、日本以及北欧等国家已制定了食品中创伤弧菌的检验方法,而我国目前尚无食品中创伤弧菌检验现行有效的标准。当前对创伤弧菌的分离培养基,主要推荐使用改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E(mCPC)琼脂平板和硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂平板。mCPC琼脂平板利用纤维二糖的分解来区别创伤弧菌与其他弧菌,霍乱弧菌菌落为紫色,创伤弧菌典型菌落为中心不透明、边缘透明的黄色。创伤弧菌在传统弧菌培养基 TCBS 琼脂平板上的菌落形态与副溶血性弧菌相似,均为绿色,不易区分。何天文等^[13]、宋曼丹等^[14]的文献报道证实了 mCPC 琼脂平板的分离效果明显好于 TCBS 琼脂平板。

实时荧光聚合酶链式反应(RT-PCR)技术由于其特异性强、灵敏度高、反应时间短等优点被广泛应用于食品、临床等样品中致病菌的检测。SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》^[15]提供了创伤弧菌可疑菌落的 RT-PCR 检测方法。

基因测序方法是准确有效的细菌鉴定方法, RNA 聚合酶 β 亚基基因(*rpoB*)与 16S 核糖体 RNA 基因(16S rRNA)都被用于相近菌株的分析和鉴定。ERLER 等^[16]、TARR 等^[17]的研究表明,基于 16S rRNA 核糖体基因序列的方法缺乏足够的分辨率来准确鉴定紧密相关的弧菌属,而功能基因 *rpoB* 的部分核苷酸序列数据更适合于在物种水平鉴定环境弧菌。*rpoB* 基因优于 16S rRNA 基因是它作为单拷贝基因存在,具有足够的系统发育信号来区分迄今为止测序的所有弧菌种类。

为了解北京市海产品中创伤弧菌的污染情况,本研究采用传统检验方法结合分子生物学方法对 2016 年北京市鱼、虾、贝 3 类 105 份海产品进行创伤弧菌的检测,同时以 *rpoB* 基因测序验证,比较了 RT-PCR 法和 VITEK 生化方法的鉴定效果,旨在对海产品中创伤弧菌引起食源性污染的潜在风险进行评估与监测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

2016 年在北京市 5 家菜市场水产区 20 个摊位

按随机采样原则采集 105 份鲜活海产品,其中鱼类 18 份、虾类 21 份、贝类 66 份。将现场采集的完整水产个体,用冰块覆盖 4 h 内送至实验室检测。

1.1.2 标准菌株

创伤弧菌标准菌株(ATCC 27562)和副溶血性弧菌标准菌株(ATCC 17802)均购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.3 主要仪器与试剂

VITEK 2 Compact、细菌比浊仪均购自法国生物梅里埃,7900HT Fast Real-Time PCR 仪(美国 Applied Biosystems),培养箱,高速离心机,台式离心机。

碱性蛋白胨水(APW)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和 mCPC 琼脂平板均购自北京陆桥技术责任有限公司,氯化钠(NaCl),革兰阴性细菌鉴定卡(GN 卡,法国生物梅里埃),PCR 引物、探针由上海生工生物有限公司合成, Gene Expression Master Mix (美国 ABI),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根 TIANGEN)。

1.2 方法

1.2.1 样品的分离培养

称取 25 g 样品放于装有 225 ml APW(含 3% NaCl)中,均质 1 min 制成增菌液,(36 ± 1) °C 增菌(24 ± 1) h 转种于 mCPC 平板,(36 ± 1) °C 培养(24 ± 1) h。挑取圆形、扁平、中心不透明、边缘透明的黄色可疑菌落接种于 3% NaCl TSA 纯化,(36 ± 1) °C 培养(24 ± 1) h。

1.2.2 RT-PCR

参照 SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》^[15],挑取 3% NaCl TSA 上的单菌落于 20 μ l TE 中,制备为模板。RT-PCR 反应体系(25 μ l):12.5 μ l 2 × Gene Expression Master Mix,1 μ l 上游引物(10 pmol/ μ l),1 μ l 下游引物(10 pmol/ μ l),0.5 μ l 探针(10 pmol/ μ l),1.0 μ l 模板,去离子水补足至 25 μ l。RT-PCR 上游引物:5'-TGTTTATGTTGAGAACGGTGACA-3',下游引物:5'-TTCTTTATCTAGGCCCAAACCTTG-3';探针序列:FAM5'-CCGTTAACCGAACCACCCGCAA-3'TAMRA。

创伤弧菌标准菌株(ATCC 27562)作为阳性对照,副溶血性弧菌标准菌株(ATCC 17802)作为阴性对照。RT-PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火延伸 1 min,同时收集 FAM(6-羧基荧光素)荧光,扩增 40 个循环。

1.2.3 VITEK 生化鉴定

细菌快速鉴定按照 VITEK 2 Compact 鉴定系统

GN卡说明书操作。用棉签挑取3% NaCl TSA上的单菌落置于装有3 ml 0.9%生理盐水的试管中进行稀释,用细菌比浊仪测菌液浓度,浓度在0.50~0.63麦氏单位。

1.2.4 *rpoB* 基因测序

挑取3% NaCl TSA上的单菌落于20 μ l TE中,离心后弃上清液,采用试剂盒法提取细菌基因组DNA,制备为模板,保存于-20 $^{\circ}$ C待用。扩增*rpoB*基因PCR反应体系(50 μ l):0.2 μ l *rTaq*酶(5 U/ μ l),5 μ l 10 \times buffer,4 μ l dNTP(2.5 mmol/L),2 μ l上游引物(10 pmol/ μ l),2 μ l下游引物(10 pmol/ μ l),1 μ l DNA模板,去离子水补充至50 μ l。*rpoB*基因扩增引物:*rpoB*458F:5'-AGGCGTGTCTTCGACAGC GATAA-3';*rpoB*2105R:5'-CGGCTACGTTACGRRCGAT ACCAG-3'。*rpoB*基因扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸90 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min^[18]。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳确定特异条带,送至上海

生工生物工程有限公司测序。测序得到基因序列与美国生物技术信息中心(NCBI)数据库中序列用BLAST程序进行比对。

2 结果与分析

2.1 创伤弧菌分离结果

105份海产品样品中有42份样品在mCPC琼脂平板上呈圆形、扁平、中心不透明或稍凹陷、边缘透明的黄色菌落;其余63份样品均未在mCPC琼脂平板上形成可疑的中心不透明、边缘透明的黄色菌落。

2.2 创伤弧菌 RT-PCR 检测结果

对42份在mCPC琼脂平板上出现典型菌落的样品进行RT-PCR检测。阳性对照菌株ATCC 27562及42份样品中的40份样品呈明显的扩增,而阴性对照菌株ATCC 17802、空白对照和其他2份样品均未有扩增,见图1。经RT-PCR检测40份样品检出创伤弧菌。

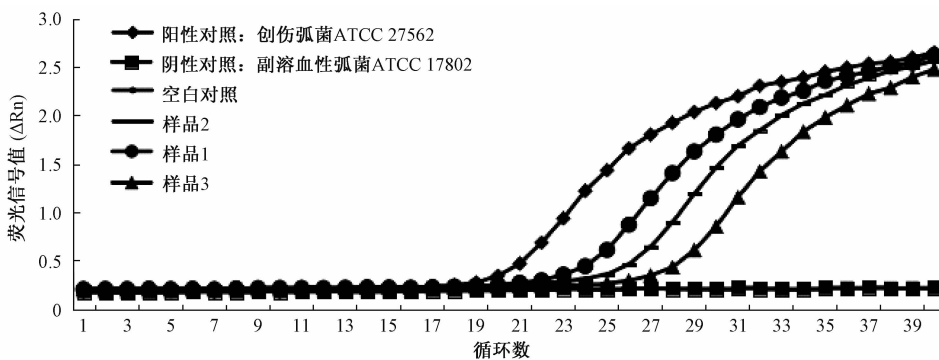


图1 创伤弧菌 RT-PCR 结果

Figure 1 Results of RT-PCR of *Vibrio vulnificus*

2.3 创伤弧菌 VITEK 生化鉴定结果

40株RT-PCR创伤弧菌阳性菌株VITEK生化鉴定结果见表1。27株鉴定为创伤弧菌;9株菌的鉴定结果为低分辨率(low discrimination),通过生化反应难以区分的主要是创伤弧菌和副溶血性弧菌;2株菌的鉴定结果与RT-PCR结果不符,鉴定结果为副溶血性弧菌;剩余2株菌不在鉴定谱内(identified organism),无法鉴定。

表1 RT-PCR、VITEK及*rpoB*基因测序结果对比

Table 1 Comparison of RT-PCR, VITEK and *rpoB* gene sequence results

菌株数	RT-PCR	VITEK	<i>rpoB</i> 基因测序
27	创伤弧菌	创伤弧菌	创伤弧菌
9	创伤弧菌	低分辨率	创伤弧菌
2	创伤弧菌	副溶血性弧菌	创伤弧菌
2	创伤弧菌	不在鉴定谱内	创伤弧菌

2.4 *rpoB* 基因测序结果

40株RT-PCR创伤弧菌阳性菌株*rpoB*基因测序结果经与NCBI数据库进行BLAST程序比对证实40株可疑菌落均为创伤弧菌。

2.5 RT-PCR、VITEK及*rpoB*基因测序结果比较

RT-PCR、VITEK及*rpoB*基因测序结果比较见表1。经*rpoB*基因序列NCBI数据库的比对结果表明,分离得到的40株分离株全部鉴定为创伤弧菌,该结果与RT-PCR鉴定结果一致;而VITEK鉴定系统结果显示40株分离株中有27株鉴定为创伤弧菌。创伤弧菌通过分子生物学方法鉴定的准确率明显高于VITEK生化鉴定法。

2.6 海产品中创伤弧菌的污染情况

105份海产品样品中有40份样品检出创伤弧菌,检出率为38.10%。虾类样品检出率高达52.38%(11/21),其次为贝类37.88%(25/66)、鱼类22.22%(4/18)。

3 讨论

创伤弧菌是近年来备受重视的影响食品安全的重要病原菌。本研究对采自北京市的105份海产品进行创伤弧菌检测,总检出率为38.10%(40/105)。近年来全国各地创伤弧菌检出情况如下:中国内陆6省(自治区)创伤弧菌检出率为3.18%^[19],2016年津南区创伤弧菌检出率为7.14%^[20],2014年开封市创伤弧菌检出率为7.87%,其中海鱼检出率为20.83%^[21],2008—2016年珠海市创伤弧菌检出率为24.29%^[22],2006—2013年广州市市售海产品中创伤弧菌检出率为24.91%^[23],珠海市海产品中创伤弧菌检出率为43.82%^[24],2014年广州市海产品中创伤弧菌检出率为66.67%^[25]。区域的不同导致了检出率的差异,内陆区创伤弧菌的检出率较低,为3.18%~7.87%;沿海地区的检出率较高,为24.29%~66.67%;北京市检出率高于内陆地区,与沿海地区相类似。这可能是因为北京市海产品来源于沿海地区,故两者相类似;北京市海产品流通量要高于内陆地区,因此检出率高。

采集种类的不同同样会导致检出率的差异。创伤弧菌在不同类别水产品中的检出率相差较大,其中虾类检出率高达52.38%,其次为贝类37.88%、鱼类22.22%。虾类检出率高于石亚素等^[26]在舟山市市售海虾中创伤弧菌的检出率(20.18%)。

40株经RT-PCR证实为创伤弧菌的菌株,进一步经*rpoB*基因测序全部鉴定为创伤弧菌,而VITEK生化鉴定只有27株鉴定为创伤弧菌,存在创伤弧菌和副溶血性弧菌难以分离的为9株,直接鉴定为副溶血性弧菌的有2株。VITEK 2 Compact细菌自动化仪器鉴定属于表型鉴定,鉴定卡内底物浓度、培养液的营养成分等都可能影响细菌的生物化学反应,从而干扰细菌鉴定;同时细菌本身因多种原因导致某些生物化学反应不典型也可能影响仪器鉴定的准确性。VITEK生化鉴定法由于创伤弧菌与副溶血性弧菌生化反应差异较小,鉴定效果无法满足日常检测工作的需要。

本研究结果显示创伤弧菌通过RT-PCR法鉴定的准确率明显高于VITEK生化鉴定法。*rpoB*基因测序方法虽然准确,但检测时间长且费用高,因而常规检测中最为便捷有效的方法为RT-PCR法。

本研究结果显示北京市海产品特别是虾类容易受到创伤弧菌的污染,因此食用海产品时应彻底加热,尽量避免生吃海产品,以免造成创伤弧菌感

染导致食物中毒。本研究提示应开展全国性的海产品中创伤弧菌的监测,并建立创伤弧菌的相关检测方法。

参考文献

- [1] STROM M S, PARANJPYE R N. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. *Microbes and Infection*, 2000, 2(2): 177-188.
- [2] RUPPERT J, PANZIG B, GUERTLER L, et al. Two cases of severe sepsis due to *Vibrio vulnificus* wound infection acquired in the Baltic Sea [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2004, 23(12): 912-915.
- [3] AMARO C, BIOSCA E G. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1454-1457.
- [4] HORSEMAN M A, SURANI S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection [J]. *International Journal of Infectious Diseases Ijid Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2011, 15(3): 157-166.
- [5] CHUNG P H, CHUANG S K, TSANG T, et al. Cutaneous injury and *Vibrio vulnificus* infection [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2006, 12(8): 1302-1303.
- [6] 中华人民共和国卫生部. 人间传染的病原微生物名录 [Z]. 2006-01-11.
- [7] FROELICH B A, PHIPPEN B, FOWLER P, et al. Differences in abundances of total *Vibrio* spp., *V. vulnificus* and *V. parahaemolyticus* in clams and oysters in North Carolina [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(2): e02265.
- [8] KIM H J, CHO J C. Genotypic diversity and population structure of *Vibrio vulnificus* strains isolated in Taiwan and Korea as determined by multilocus sequence typing [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142657.
- [9] YOKOCHI N, TANAKA S, MATSUMOTO K, et al. Distribution of virulence markers among *Vibrio vulnificus* isolates of clinical and environmental origin and regional characteristics in Japan [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55219.
- [10] 孙智夫, 翁永夫, 耿晓冬, 等. 舟山市市售生食海产品中创伤弧菌污染现状研究 [J]. *中国预防医学杂志*, 2013, 14(3): 179-182.
- [11] 龚红霞, 黄丽君, 张辉. 舟山市贝类海产品致病性弧菌污染监测结果 [J]. *浙江预防医学*, 2016, 28(5): 510-512.
- [12] 赵忠俊, 于明明, 王晓威, 等. 2016年潍坊市市售动物性水产品中副溶血性弧菌和创伤弧菌污染状况研究 [J]. *预防医学论坛*, 2017, 23(4): 263-265.
- [13] 何天文, 陈亮亮, 卢勉飞, 等. 三种创伤弧菌分离培养基的性能测试研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 23(6): 1469-1472.
- [14] 宋曼丹, 严纪文, 朱海明, 等. 贝甲类海产品中创伤弧菌的检验方法的探讨 [J]. *华南预防医学*, 2012, 38(1): 70-72.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法: SN/T 1870—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [16] ERLER R, WICHELS A, HEINEMEYER E A, et al. *Vibrio* base:

- a MALDI-TOF MS database for fast identification of *Vibrio* spp. that are potentially pathogenic in humans [J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2015, 38(1):16-25.
- [17] TARR C L, PATEL J S, PUHR N D, et al. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(1):134-140.
- [18] OBERBECKMANN S, WICHELS A, MAIER T, et al. A polyphasic approach for the differentiation of environmental *Vibrio* isolates from temperate waters [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 75(1):145-162.
- [19] 裴晓燕, 余波, 张秀丽, 等. 中国内陆 6 省(自治区)淡水鱼养殖、销售和餐饮环节常见嗜盐性弧菌污染调查 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(1):79-83.
- [20] 聂小才, 刘坚龄, 赵文. 2016 年津南区食品微生物污染监测分析 [J]. *中国城乡企业卫生*, 2017, 32(1):166-168.
- [21] 黄淑华, 陈磊, 刘杰, 等. 开封市 2014 年水产品养殖和销售加工过程中致病性弧菌污染状况调查 [J]. *医学动物防制*, 2015, 31(9):980-982.
- [22] 杨春晓, 方艳梅, 袁筱茜, 等. 2008 年—2016 年珠海市市售食品中病原菌污染状况分析 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(15):2158-2161.
- [23] 李迎月, 何洁仪, 张维蔚, 等. 广州市市售水产品食源性致病细菌污染状况调查 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(3):294-297.
- [24] 曹敏华, 邝琳, 黄琳, 等. 珠海地区海产品中创伤弧菌污染状况和药敏分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(15):2011-2012, 2015.
- [25] 陈佳璇, 邓志爱, 和鹏, 等. 2014 年广州市生吃水产品中创伤弧菌污染状况调查分析 [J]. *医学动物防制*, 2017, 33(6):664-666.
- [26] 石亚素, 潘军航, 张全忠, 等. 2010 年舟山市市售海虾中创伤弧菌的定量检测及其基因分型 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(8):1848-1849, 1852.

· 资讯 ·

美国制修订联氟砒 (Fluensulfone) 在部分商品中的残留限量

美国制修订联氟砒 (Fluensulfone) 在部分商品中的残留限量。涉及杏仁、葡萄、甘蔗、坚果等新制定限量, 大麦、小麦、燕麦等修订限量。具体内容如下:

制定:

商品	最大残留限量/ppm
带壳杏仁	4.0
仁果类水果, 第 11-10 组	0.30
小型蔓生水果, 第 13-07D 亚组	0.60
核果类, 第 12-12 组	0.07
葡萄	0.90
树坚果, 第 14-12 组	0.01
甘蔗	0.04
甘蔗糖蜜	0.20

修订:

商品	最大残留限量/ppm	商品	最大残留限量/ppm
大麦麸	0.10	燕麦干草	8.0
大麦谷物	0.06	燕麦秸秆	4.0
大麦干草	8.0	小麦麸	0.10
大麦秸秆	4.0	小麦草料	4.0
荞麦仁	0.06	小麦胚芽	0.07
粮谷类草料、粗草料和秸秆, 第 16 组	2.0	小麦粒	0.06
谷物, 第 15 组	0.03	小麦干草	8.0
燕麦草料	4.0	小麦碾磨副产品	0.08
燕麦粒	0.06	小麦秸秆	4.0

(来源食品伙伴网, 相关链接: <http://www.foodmate.net/law/usa/193480.html>)