

实验技术与方法

水产品中创伤弧菌检测方法建立与应用

白瑶¹, 叶淑瑶^{1,2}, 江涛¹, 柳江山^{1,2}, 李孟寒¹, 李志刚¹, 李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:目的 建立一种水产品中创伤弧菌检测方法,并对北京市市售水产品中创伤弧菌污染情况进行监测。方法 分别使用18株创伤弧菌菌株和水产品中常污染的背景杂菌,定量接种于检测创伤弧菌的选择性增菌液和4种选择性平板,优化出适合创伤弧菌检测的选择性培养基。采用聚合酶链式反应(PCR)法和增菌培养法分别检测样品中的创伤弧菌后进行方法对比,建立PCR和增菌培养法相结合的检测方法,并应用此方法研究北京市市售水产品中创伤弧菌污染状况。结果 改良后的选择性增菌液适用于创伤弧菌的检测。北京市市售水产品中创伤弧菌检出率为15.7% (18/115),其中贝类、蟹类、鱼类和虾类样品的检出率分别为23.4% (15/64)、8.3% (1/12)、5.3% (1/19)和5.0% (1/20)。结论 PCR法与传统增菌培养法相结合,可有效提高创伤弧菌检测效率。北京市市售贝类等水产品中创伤弧菌污染率较高,需引起食品安全风险监测重点关注。

关键词:水产品; 创伤弧菌; 选择性培养基; 检测方法; 污染率; 食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2018)06-0592-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.06.008

Development and application of detection method for *Vibrio vulnificus* in aquatic productsBAI Yao¹, YE Shuyao^{1,2}, JIANG Tao¹, LIU Jiangshan^{1,2}, LI Menghan¹, LI Zhigang¹, LI Fengqin¹

(1. NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China)

Abstract: Objective To develop a method for *Vibrio vulnificus* (*V. vulnificus*) detection from aquatic products for the contamination monitoring. **Methods** The selective medium specific for *V. vulnificus* detection was optimized by inoculating 18 *V. vulnificus* strains and common competing flora in aquatic products into 8 selective enrichment broth and 4 selective plates. Then the method was established and validated which was combined polymerase chain reaction (PCR) method with enrichment culture method for detecting *V. vulnificus* through comparing the performance of these two method. And the method was applied to *V. vulnificus* detection from Beijing commercial aquatic products for the contamination monitoring. **Results** The modified selective enrichment broth was applied to *V. vulnificus* detection. The isolation rate in Beijing retail aquatic products was 15.7% (18/115). Isolation rate in shellfish products was 23.4% (15/64). Isolation rate in crab products was 8.3% (1/12). Isolation rate in fish products was 5.3% (1/19). Isolation rate in shrimp products was 5.0% (1/20). **Conclusion** The method that combined PCR with traditional enrichment culture method exhibited a better isolation rate. A higher contamination rate of *V. vulnificus* in shellfish products was found which should be paid attention to.

Key words: Aquatic products; *Vibrio vulnificus*; selective medium; detection method; contamination rate; foodborne pathogenic

收稿日期:2018-10-23

基金项目:国家卫生和计划生育委员会食品安全国家标准制定项目 (spaq-2016-189);国家食品安全风险评估中心青年科研基金(201802011)

作者简介:白瑶 女 助理研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: baiyao@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物

E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)属于革兰阴性嗜盐性弧菌,广泛分布于海产品、海水、海底沉积物、盐湖和沿海环境中^[1-3]。该菌常有单端极性鞭毛,兼性厌氧,有荚膜、无芽胞,但在营养条件较差时会成为球形体,形成一种活而不可培养(viable but non-culturable, VBNC)状态。食用被创伤弧菌污染的海产品是引起人类感染的主要途径,而创伤弧菌感染

能够引起人类胃肠炎^[2]和原发性败血症等,且后者的病死率超过 50%^[4]。伤口感染创伤弧菌严重者需大面积清创、截肢甚至死亡^[5-11],由此带来严重的经济和社会负担。创伤弧菌在牡蛎、贻贝等海产品中的检出率为 13%~95%^[12-16],我国内陆地区水产品中创伤弧菌的检出率一般在 10%以内,沿海地区的检出率常在 20%~67%之间^[17-20]。

目前美国、加拿大等国家均有标准化的创伤弧菌检验方法,而我国尚无创伤弧菌的食品微生物学检验标准方法。国内常用的检测方法包括增菌培养法、聚合酶链式反应(PCR)法等分子生物学检测方法,其中,增菌培养法由于样品中背景杂菌种类和数量较多,对创伤弧菌的分离造成较大干扰,极有可能造成漏检而使样品呈现假阴性;单独使用 PCR 等分子生物学方法检测,虽然其特异性强、灵敏度高^[21-23],但并不能分离得到创伤弧菌菌株,可能造成样品检测结果呈假阳性,也不利于开展对菌株生物学特征的深入分析工作。本研究通过对我国水产品中除创伤弧菌以外的常见背景杂菌进行分类和生长分析,调整并优化选择性培养基成分,建立一种检测水产品中创伤弧菌的微生物学方法,并用所建方法对北京市市售水产品中创伤弧菌污染状况进行监测,为开展膳食暴露创伤弧菌对我国居民健康影响的风险评估工作提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

创伤弧菌标准菌株 2 株(CICC 10383、CICC 21615)、分离菌株 16 株;海产品中常污染的背景杂菌标准菌株溶藻弧菌(CICC 10484、CICC 10889)、副溶血性弧菌(CICC 21617、ATCC 17802)、霍乱弧菌(CICC 23794、CICC 23795)、河流弧菌(CICC 21612)、拟态弧菌(CICC 10474),以及分离菌株大肠埃希菌、温和气单胞菌、变异库克菌、摩氏摩根菌等。标准菌株均购自中国工业微生物种保藏管理中心,分离菌株均由本实验室保藏。

1.1.2 主要仪器与试剂

基因扩增仪、凝胶成像系统均购自美国 Bio-Rad, Vitek 2 细菌浊度计、API 20E 生化试验鉴定试剂条均购自法国 Bio Mérieux,生物安全柜,高压灭菌器,隔水式恒温培养箱,恒温金属浴装置,台式高速离心机。

碱性蛋白胨水(APW)、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基(TCBS)、改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E 琼脂(mCPC)、纤维二糖-多粘菌素 E 琼脂(CC)、胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)均购自美

国 BD,蛋白胨-氯化钠-纤维二糖(PNC)增菌液(青岛海博生物技术有限公司),科玛嘉弧菌显色培养基(CV,法国 CHROMagar),多粘菌素 E(北京陆桥技术股份有限公司),PCR 反应和电泳配套试剂,氯化钠(NaCl)等化学试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 检测创伤弧菌最适增菌液的筛选

为评价创伤弧菌在选择性增菌液中的生长情况,将创伤弧菌标准菌株的新鲜培养物制成菌悬液后,分别定量接种于 NaCl 含量为 1%、2%、3% 的 APW 增菌液和多粘菌素 E 含量为 0、1、2、3、4 U/ml 的 PNC 增菌液中,37℃培养 18 h 后,分别取 100 μl 适宜浓度的稀释液,涂布于含 3% NaCl 的 TSA 平板,同时设 3 个平行,通过平板计数法对每种增菌液中的创伤弧菌分别计数。

为评价选择性增菌液对样品中背景杂菌的抑制效果,将副溶血性弧菌、溶藻弧菌等背景干扰菌分别定量接种于含 3% NaCl 的 APW 增菌液和含有 1 U/ml 多粘菌素 E 的 PNC 增菌液(简称 PNCC 增菌液),使其终浓度达到 10³ CFU/ml,同时设 3 个平行。37℃培养 18 h 后,通过表面涂布法对 2 种增菌液中的背景杂菌分别计数,筛选出检测创伤弧菌的最适增菌液。

为评价最适增菌液的增菌效果,将创伤弧菌标准菌株分别定量接种于筛选出的最适增菌液,使增菌液中创伤弧菌的终浓度分别为 10⁰、10¹、10²、10³ CFU/ml,37℃培养 18 h 后,通过表面涂布法进行菌落计数。

1.2.2 创伤弧菌分离用最适选择性平板的筛选

为评价选择性培养基对创伤弧菌和背景杂菌生长的影响,分别取创伤弧菌和常见背景杂菌标准菌株的新鲜培养物,用无菌生理盐水制成菌悬液,分别取 100 μl 适宜浓度的稀释液涂布于含 3% NaCl 的 TSA 平板和 TCBS、CV、mCPC、CC 4 种选择性平板,每种平板设 3 个平行,37℃培养 18 h 后进行菌落计数。以植板率表示创伤弧菌在选择性平板和含 3% NaCl 的 TSA 平板上的菌落数差异,筛选出创伤弧菌分离用最适选择性培养基。植板率=(选择性平板上的菌落数/含 3% NaCl 的 TSA 平板上的菌落数)×100%。

1.2.3 PCR 法在创伤弧菌检测中的应用

1.2.3.1 PCR 检测样品匀浆液

将水产品样品匀浆后,吸取 1 ml 匀浆液于 1.5 ml EP 管中,3 000 × g 离心 5 min 后弃上清液,向沉淀中加入 1 ml 超纯水,使其充分混匀并悬浮,100℃加热 10 min 后,10 000 × g 离心 10 min,上清

液即为样品 DNA 模板,PCR 检测 *vhA* 基因,保留阴性样品备用。

创伤弧菌检测结果为阴性的样品(每份 25 g)中,分别加入 1 ml 浓度为 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 CFU/ml 的创伤弧菌标准菌株菌悬液,混匀后提取 DNA,PCR 检测 *vhA* 基因。将加标样品和阴性对照样品分别用 CC 和 mCPC 平板检测分离创伤弧菌,同时取菌悬液涂布于含 3% NaCl 的 TSA 平板用于菌落计数。

1.2.3.2 PCR 检测样品增菌液

采集 80 份新鲜牡蛎等海产品样品进行预试验,按照美国食品药品监督管理局(FDA)推荐的方法检测样品中的创伤弧菌,增菌后划线接种于选择性平板的同时,取新鲜增菌液提取 DNA,PCR 检测 *vhA* 基因,统计 PCR 检测结果阳性样品与分离鉴定结果相吻合的比例,验证 PCR 法是否可以应用于增菌液中创伤弧菌的检测。

PCR 检测目的基因 *vhA* 的上游引物:5'-ccgcgggtacaggtggcgca-3',下游引物:5'-cgccaccacttcgggccc-3',预期片段大小为 519 bp。PCR 反应体系(25 μ l):2 \times PCR Master Mix 12.5 μ l,上、下游引物(25 μ mol/L)各 0.4 μ l,DNA 模板 1 μ l,加超纯水至 25 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,62 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,25 个循环;72 $^{\circ}$ C 末端延伸 10 min。产物若不能立即检测需 4 $^{\circ}$ C 保存。随后使用琼脂糖凝胶电泳方法检测 PCR 结果。

1.2.4 样品检测

为调查北京市水产品中创伤弧菌污染情况,2018 年 3~8 月期间从北京市 24 个超市和水产市场的零售点采集 115 份水产品样品,样品种类包括鱼、虾、蟹、贝类等,采用已建立的检测方法进行创伤弧菌检验,分别统计不同种类水产品中检验结果为阳性的样品数量。

1.3 统计学分析

通过平板计数法对 8 种增菌液中的创伤弧菌分别计数,采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,多重组间比较采用 Tukey 法进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,评价创伤弧菌在不同增菌液中的生长状况。

2 结果

2.1 检测创伤弧菌最适增菌液的筛选

创伤弧菌标准菌株菌悬液接种于 8 种增菌液,培养 18 h 后稀释 10^5 倍,用含 3% NaCl 的 TSA 平板进行计数,统计分析结果见表 1,多粘菌素 E 添加量为 1 U/ml 的 PNCC 增菌液增菌效果优于普通的

APW 增菌液和不添加多粘菌素 E 的 PNC 增菌液。

表 1 创伤弧菌在 8 种增菌液中生长状况

Table 1 Growth status of *Vibrio vulnificus* was compared in 8 kinds of enrichment broth

增菌液基础成分	添加成分	平板计数/(个/皿)	Tukey 法分析*
PNC	—	48	BC
PNC	1 U/ml 多粘菌素 E	84	A
PNC	2 U/ml 多粘菌素 E	66	AB
PNC	3 U/ml 多粘菌素 E	69	AB
PNC	4 U/ml 多粘菌素 E	48	BC
APW	1% NaCl	28	C
APW	2% NaCl	46	BC
APW	3% NaCl	37	C

注:—表示无添加成分;* 不同字母表示差异有统计学意义($P < 0.05$)

背景杂菌在含 3% NaCl 的 APW 和 PNCC 增菌液中培养 18 h 后,分别取适宜稀释度的增菌液 100 μ l 涂布于含 3% NaCl 的 TSA 平板培养计数,可观察到主要背景杂菌(包括溶藻弧菌和副溶血性弧菌等)在 PNCC 增菌液中增菌时明显受到抑制,数量大幅度减少,使得菌落直径较小的创伤弧菌菌落不易被背景杂菌生长所掩盖。综上,检测创伤弧菌的最适增菌液为 PNCC 增菌液。

2.2 检测创伤弧菌最适选择性平板的筛选

创伤弧菌标准菌株菌悬液在 TCBS、CV、mCPC、CC 平板上的植板率分别为 0.055%、0.000 012%、0.025% 和 0.027%,由此可见,4 种平板上创伤弧菌的生长均受到不同程度的抑制,且抑制程度差别较大;TCBS、CC 和 mCPC 平板上植板率较高,即对创伤弧菌生长的抑制作用相对较小,而 CV 平板对创伤弧菌生长有强烈抑制作用。

4 种选择性平板对非弧菌属背景杂菌具有很强的抑制作用,但主要干扰创伤弧菌分离的背景杂菌为副溶血性弧菌和溶藻弧菌,二者在 4 种选择性平板上的植板率见表 2。4 种选择性培养基对溶藻弧菌的抑制效果明显,优于对副溶血性弧菌的抑制效果,CC 和 mCPC 平板对副溶血性弧菌的抑制效果相对优于 TCBS 和 CV 平板。综上,检测创伤弧菌的最适选择性平板为 CC 和 mCPC 平板。

表 2 4 种选择性平板上副溶血性弧菌和溶藻弧菌的生长状况

Table 2 Growth status of *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* were compared in 4 kinds of selective medium

平板种类	植板率/%	
	副溶血性弧菌	溶藻弧菌
TCBS	98	—
CV	42	0.000 020
mCPC	0.014	—
CC	0.038	—

注:—表示该平板上菌落数量极少

2.3 PCR法在创伤弧菌检测中的应用

用PCR法检测创伤弧菌标准菌株添加量为 10^3 CFU/25 g的样品匀浆液,检测结果却显示阴性,因此,PCR法不适用于未增菌的样品匀浆液中创伤弧菌的检测。样品增菌液的PCR检测结果表明,PNCC增菌液中*vhA*基因PCR检测阳性的24份样品中,22份样品可分离得到创伤弧菌。综上所述,PCR-*vhA*基因检测方法可用于样品增菌液中创伤弧菌的初筛。

2.4 水产品中创伤弧菌污染检测结果

本研究采集的115份样品中有18份检出创伤弧菌,阳性率为15.7%,阳性样品分别来自8个不同的采样地点。其中,贝类、蟹类、鱼类和虾类样品的检出率分别为23.4% (15/64)、8.3% (1/12)、5.3% (1/19)和5.0% (1/20)。

3 讨论

本试验改良后的PNCC增菌液在APW增菌液的基础上,添加了多粘菌素E (1 U/ml)、蛋白胨 (40 g/L)和纤维二糖 (0.8 g/L),由于创伤弧菌对纤维二糖的代谢利用率较高,培养基中充足的氮源和碳源成分供创伤弧菌生长代谢,可明显促进创伤弧菌生长^[24]。多粘菌素E是一类碱性多肽类抗生素,可抑制肠杆菌属、埃希菌属等多种革兰阴性菌的生长。文献^[24]报道,创伤弧菌与弧菌属其他物种不同,仅有约3%的创伤弧菌对多粘菌素类抗生素敏感。改良后的PNCC增菌液在APW增菌液的基础上,多粘菌素E的添加量为1 U/ml时,对创伤弧菌的生长无抑制作用,且创伤弧菌在此浓度下的菌落生长数量明显高于不添加多粘菌素E的PNC增菌液。而对副溶血性弧菌、溶藻弧菌等杂菌的生长结果分析表明,常见背景杂菌在多粘菌素E添加量为1 U/ml的PNC增菌液中生长受到抑制,杂菌菌落生长数量明显降低,故改良后的PNCC增菌液可用于水产品中创伤弧菌的检测。

TCBS、CV、mCPC、CC 4种选择性平板均是弧菌分离常用的选择性平板,其中,创伤弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌在CV平板上显示出不同的颜色,虽可以准确辨识出目标菌和干扰菌,但由于CV平板对创伤弧菌的抑制率过高,不利于低浓度污染水平的样品中创伤弧菌的检测。TCBS平板可抑制水产品中非弧菌属的背景菌生长^[25],对创伤弧菌生长的抑制性也较弱,但TCBS平板非常适合于常见干扰菌副溶血性弧菌生长,且副溶血性弧菌在TCBS平板上生长的菌落直径较大,不利于平板上创伤弧菌的分离。mCPC^[25]和CC^[26]平板中均添加了适合

创伤弧菌生长的纤维二糖成分,且培养基中添加多粘菌素类抗生素,对检测创伤弧菌的主要常见背景杂菌(如副溶血性弧菌和溶藻弧菌等)有一定的抑制效果,因此,选择mCPC和CC平板相结合,作为创伤弧菌的选择性分离平板,与国际标准检测方法^[25]一致。

PCR法在检测添加创伤弧菌标准菌株的水产品样品匀浆液时,添加创伤弧菌的终浓度达到 10^3 CFU/25 g时,PCR法仍未检出,可能是由于水产品样品匀浆液中基质成分复杂,PCR法在食品类样品直接检测时灵敏度不足,这与文献^[22]报道PCR-*vhA*的检出限为 10^4 CFU/g (ml)相一致,故将PCR法直接用于水产品样品匀浆液的初筛过程并不可行。由于*vhA*基因为种属特异性基因,创伤弧菌*vhA*基因阳性率为100%,FDA把PCR检测*vhA*基因作为鉴定方法用于创伤弧菌疑似菌落的确证^[22]。MARK等^[23]于2003年建立了基于*vhA*基因的实时荧光定量PCR法检测牡蛎中的创伤弧菌,该方法已被ISO/TS 21872采纳,也是本研究选择的创伤弧菌菌种确证鉴定方法之一。

PNCC增菌液中*vhA*基因PCR检测阳性的24份样品中,22份样品可分离得到创伤弧菌。PCR筛选结果阳性的样品未分离到创伤弧菌的原因:一是创伤弧菌在营养条件不佳或温度过低时,容易形成VBNC状态,因此检测时没有培养培养检测到创伤弧菌;二是PCR检测中无法区分目标菌株的存活状况,可能检测到的DNA来自已经死亡的创伤弧菌。即便PCR检测在样品增菌液中的初筛过程可能出现少量的假阳性结果,仍有后续的传统培养检测方法与其结合,通过分离菌株后的鉴定试验来确保样品检测结果可靠。PCR法具有检测时间短、灵敏度高的特点,可有效提高后续检测目标的针对性,因此PCR-*vhA*基因检测方法可用于样品增菌液中创伤弧菌的初筛。

本试验采集的115份样品中有18份检出创伤弧菌,检出率为15.7%,与法国(12.6%)^[13]、马来西亚(13.0%)^[15]等国家报道的海产品中创伤弧菌污染率相近,远低于德国报道的污染率(55%)^[27]。不同种类水产品的创伤弧菌污染率差异较大。牡蛎等贝类产品由于其蛋白质含量高、摄食方式为滤食的特点,极易被创伤弧菌污染,且人们多有生食牡蛎的习惯,因此牡蛎成为国外重点关注的水产品。本试验采集的贝类样品中创伤弧菌的检出率为23.4%,高于意大利(8.9%)^[28]、新西兰(17.2%)^[16]和泰国(22.1%)^[29],但远低于美国(95.0%)^[12]和瑞典(63.0%)^[30]等国家报道的检出

率。对于蟹类、鱼类和虾类样品,本试验的检出率均在10%以下,与国内多数内陆地区检出率相近,而北京市其他研究报道创伤弧菌的检出率为38.1%^[20],可能与检测样品的采样季节、采样地点、样品数量等因素密切相关。

综上,本试验建立的将PCR法与传统增菌培养法相结合的创伤弧菌检测方法,可以有针对性的检测水产品中创伤弧菌污染状况,有效提高水产品中创伤弧菌检测和菌种确证试验的工作效率。贝类等水产品中创伤弧菌污染率较高,需引起食品安全风险监测重点关注。下一步研究中,可通过水产品中创伤弧菌定量检测,广泛、深入调查其污染率和污染水平,为开展膳食暴露创伤弧菌对我国居民健康影响的风险评估、制定即食水产品中创伤弧菌限量标准等工作提供科学依据。

参考文献

- [1] TEY Y H, JONG K J, FEN S Y, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio vulnificus* in the aquacultural environments of Taiwan[J]. J Food Prot, 2015, 78(5):969-976.
- [2] ELBASHIR S, PARVEEN S, SCHWARZ J, et al. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: a review[J]. Food Microbiol, 2018, 70(9): 85-93.
- [3] CANIGRAL I, MORENO Y, ALONSO J L, et al. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area[J]. Microbiol Res, 2010, 165(8): 657-664.
- [4] JONES M K, OLIVER J D. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis [J]. Infection and Immunity, 2009, 77(5): 1723-1733.
- [5] 潘军航,沈伟伟,张严峻,等.一株死亡患者分离的致死创伤弧菌菌株的耐药表型与分子特征[J].疾病监测,2016,31(3):229-232.
- [6] VUGIA D J, FARZANEH T, NEWTON A E, et al. Impact of 2003 state regulation on raw oyster-associated *Vibrio vulnificus* illnesses and deaths, California, USA[J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(8): 1276-1280.
- [7] GUTIERREZ E M. *Vibrio vulnificus* infections associated with eating raw oysters-Los Angeles[J]. Morbidity Mortality Weekly Report, 1996, 45(29): 621-624.
- [8] YUN N R, KIM D M. *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health[J]. Korean J Internal Medicine, 2018, 33(6):159.
- [9] 高仲雷.原发性创伤弧菌败血症19例分析[J].浙江临床医学,2004,6(2):135-136.
- [10] ELMAHDI S, DASILVA L V, PARVEEN S. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various countries: a review[J]. Food Microbiol, 2016, 57(2): 128-134.
- [11] MATSUOKA Y, NAKAYAMA Y, YAMADA T. et al. Accurate diagnosis and treatment of *Vibrio vulnificus* infection: a retrospective study of 12 cases[J]. Braz J Infect Dis, 2013, 17(1): 7-12.
- [12] JONES J L, LUDEKE C H M, BOWERS J C, et al. Abundance of *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus*, and *V. parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and clams (*Mercenaria mercenaria*) from Long Island sound [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(24):7667-7672.
- [13] ROBERT-PILLOT A, COPIN S, HIMBER C, et al. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR[J]. Int J Food Microbiol, 2014, 189(17): 75-81.
- [14] FUKUSHIMA H, KANSENSHOGAKU Z. Distribution of *Vibrio vulnificus* along the coastal area of Shimane Prefecture and contamination of retail fish and shellfish with *V. vulnificus* in Shimane Prefecture, Japan [J]. Kansenshogaku Zasshi, 2006, 80(3):220-230.
- [15] PAYDER M, THONG K L. Prevalence and genetic characterization of *Vibrio vulnificus* in raw seafood and seawater in Malaysia[J]. J Food Prot, 2013, 76(10): 1797-1800.
- [16] KIRS M, DEPAOLA A, FYFE R, et al. A survey of oysters (*Crassostrea gigas*) in New Zealand for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 147(2): 149-153.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 李迎月,何洁仪,张维蔚,等.广州市市售水产品食源性致病菌污染状况调查[J].中国食品卫生杂志,2015,27(3): 294-297.
- [20] 王紫薇,汪琦,赵晓娟,等.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[J].中国食品卫生杂志,2018,30(2):182-186.
- [21] WRUGHT A C, MICELI G A, LANDRY W L, et al. Rapid identification of *Vibrio vulnificus* on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe [J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(2): 541-546.
- [22] HILL W E, KEASLER S P, TRUCKSESS M W, et al. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters [J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(3): 707-711.
- [23] MARK S C, ANITA C W. Real-time PCR analysis of *Vibrio vulnificus* from oysters [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(12): 7137-7144.
- [24] HSU W Y, WEI C I, TAMPLIN M L. Enhanced broth media for selective growth of *Vibrio vulnificus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(7): 2701-2704.
- [25] U. S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual chapter 9 *Vibrio* [S]. 2004.
- [26] HOI L, DALSGAARD I, DALSGAARD A. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistinagar [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(5): 1721-1724.

- [27] TTT V, ALTER T, HUEHN S. Prevalence of *Vibrio* spp. in retail seafood in Berlin, Germany [J]. J Food Prot, 2018, 81(4):593-597.
- [28] PASSALACQUA P L, ZAVATTA E, BIGNAMI G, et al. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in the clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy [J]. Ital J Food Saf, 2016, 5(1):5709.
- [29] CHANGHAI N, SAUNJIT S. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in retail raw oysters from the eastern coast of Thailand, Southeast Asian [J]. J Trop Med Public Health, 2014, 45(3):662-669.
- [30] COLLIN B, REHNSTAM-HOLM A S. Occurrence and potential pathogenesis of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* on the South Coast of Sweden [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2011, 78(2):306-313.

实验技术与方法

不同水源中 G II 型诺如病毒实时荧光逆转录聚合酶链式反应检测方法建立及应用

李楠,王佳慧,李凤琴,江涛

(国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

摘要:目的 建立不同水源中 G II 型诺如病毒(NoV G II)实时荧光逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法,对某市疾病预防控制中心送检的 10 份疑似引起诺如病毒中毒的水样进行 NoV G II 检测。方法 以瓶装水、河水和生活污水为研究对象,采用硝酸纤维素膜-聚乙二醇(PEG)沉淀法富集病毒,对取样体积、病毒洗脱条件、PEG 终浓度及 PEG 沉淀条件等进行了优化,提取病毒 RNA、建立实时荧光 RT-PCR 检测方法;通过外加 MS2 计算方法的回收率,评价所建方法对水样中诺如病毒的回收效果。结果 建立的方法对瓶装水、河水和生活污水中 NoV G II 的平均回收率分别为 $(60.1 \pm 8.0)\%$ 、 $(22.0 \pm 6.5)\%$ 和 $(35.7 \pm 8.1)\%$, 10 份送检水样中 3 份检出 NoV G II。结论 建立的实时荧光 RT-PCR 方法适用于瓶装水、河水和生活污水中 NoV G II 的检测,饮用水被 NoV G II 是引发某市人员中毒的原因之一。

关键词:实时荧光逆转录聚合酶链式反应; G II 型诺如病毒; 水; 检测方法

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2018)06-0597-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.06.009

Development and application of real-time reverse transcription polymerase chain reaction for detection of *Norovirus* G II in water

LI Nan, WANG Jiahui, LI Fengqin, JIANG Tao

(NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To develop a real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method for detection of *Norovirus* G II (NoV G II) in water. To survey NoV G II in 10 water samples. **Methods** Nitrocellulose membrane and PEG precipitation were used to enrich virus in bottle water, river and sewage samples, and real-time RT-PCR method was developed. The recoveries from MS2 spiked samples were used to evaluate the effect of the established method. **Results** The average recoveries of bottle water, river and sewage samples were $(60.1 \pm 8.0)\%$, $(22.0 \pm 6.5)\%$ and $(35.7 \pm 8.1)\%$ respectively. Three in 10 submitted water samples were positive for NoV G II. **Conclusion** A real-time PCR method for detection of NoV G II in water sources was developed in this study. NoV G II was one of the reasons of the poisoning incidents.

Key words: Real-time reverse transcription polymerase chain reaction; *Norovirus* G II; water; detection method

收稿日期:2018-11-14

作者简介:李楠 女 副研究员 研究方向为食品卫生 E-mail:linan100041@cfsa.net.cn

通信作者:江涛 男 研究员 研究方向为食品卫生 E-mail:jiangtao001@cfsa.net.cn