

论著

东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的监测

陈 艳¹ 梅玲玲² 李秀桂³ 闻 剑⁴ 朱海明⁴ 马群飞⁵ 付 萍¹ 刘秀梅¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051; 3. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 南宁 530028; 4. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300; 5. 福建省疾病预防控制中心, 福建 福州 350001)

摘 要:目的 了解我国东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的污染状况。方法 采用 3 %氯化钠碱性蛋白胨水增菌,改良纤维二糖 - 多粘菌素 B - 多粘菌素 E(mCPC) 琼脂和纤维二糖 - 多粘菌素 E(CC) 琼脂分离海产品试样中的创伤弧菌,可疑菌落的鉴定采用生化试验或 PCR 法。采用最可能数 (MPN) 法和 PCR 法检测牡蛎试样的创伤弧菌污染水平。结果 天然污染海产品试样创伤弧菌的检出率为 19.8 % (20/101)。牡蛎试样中 45 % (55/122) 创伤弧菌密度低于 3 MPN/g 的最低检出限。牡蛎中创伤弧菌的污染水平存在季节性差异。结论 未来应加强对我国海产品中创伤弧菌污染状况的监测,尤其是在温暖的季节。

关键词:创伤弧菌;海产品;食品污染

Detection and Enumeration of *Vibrio Vulnificus* in Retail
Seafoods from Coastal Areas of Southeastern China

CHEN Yan, MEI Ling-ling, LI Xiu-gui, WEN Jian, ZHU Hai-ming, MA Qun-fei, FU Ping, LIU Xiu-mei
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract : Objective To investigate the contamination of *Vibrio vulnificus* contamination in retail seafoods collected from coastal areas of southeastern China. **Method** Following enrichment in alkaline peptone water, modified cellobiose-polymixin B-colistin agar and cellobiose-colistin agar were used for the isolation of *V. vulnificus* from seafood samples. The suspected colonies were confirmed by biochemical testing or PCR assay. The most probable number (MPN) technique and PCR assay were used for the detection and enumeration of *V. vulnificus* in oyster samples. **Results** Of the 101 seafood samples tested, 20 (19.8 %) were positive for *V. vulnificus*. Of the 122 oyster samples, 55 (45 %) had *V. vulnificus* densities below the detectable level of 3 MPN/g. The level of *V. vulnificus* in oysters varied in different seasons. **Conclusion** *V. vulnificus* needs to be intensively monitored in seafoods in China, especially during warmer months.

Key words: *Vibrio Vulnificus*; Seafood; Food Contamination

创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 是自然生存于河口和海洋环境中的一种革兰阴性嗜盐菌,能够导致胃肠炎、伤口感染和原发性败血症,后者病死率达 50 %。人类感染途径包括食用生的或半生的带菌海产品,以及肢体破损伤口接触带菌的海水或海洋动物。本菌对于慢性肝病、糖尿病患者或免疫功能低下者的危害相当严重,这些个体一旦感染创伤弧菌,更易发生致命的原发性败血症。创伤弧菌是美国海产品消费引起死亡的首要原因,日本每年创伤弧菌败血症病例数约为 425 例,我国台湾地区 1996 - 2000 年每年创伤弧菌感染人数为 13~26 例^[1,2]。由于创伤弧菌感染并非法定报告疾病,因而无法了解

我国人群的疾病发生现状,据文献报道,浙江某医院 1998 - 2002 年间收治了 12 例创伤弧菌败血症患者^[3]。

北欧食品分析委员会 (NMKL)、美国食品药品监督管理局 (FDA)、加拿大和日本等国际组织和国家有检验食品中创伤弧菌的方法^[4-7],我国目前没有适用于食品中创伤弧菌检验的国家标准,GB/T 4789.7—2008 的适用范围为水产品及食物中毒样品中副溶血性弧菌的检验,仅在该标准中与其他弧菌的鉴别部分提到了创伤弧菌^[8]。当前我国创伤弧菌食物中毒病人的诊断是按 GB/T 4789.7—2008 操作,从剩余可疑中毒食品及病人粪便中检出形态、生化反应一致的菌株^[9]。本研究拟采用 FDA 方法调查我国沿海地区零售海产品创伤弧菌的污染状况,以期为我国海产品创伤弧菌监测工作的深入开展提供科学依据。

基金项目:国家自然科学基金 (30600499)

作者简介:陈 艳 女 副研究员

通讯作者:刘秀梅 女 研究员

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试样

染菌试样购自浙江和广东的超市或水产品批发市场。2007年7月至2008年4月,在浙江、广东和广西3省的超市、集贸市场或水产品批发市场,按照无菌采样原则采集海产品,试样种类包括贝类、甲壳类和鱼类。将试样置4℃保存,3~8 h内检验。

1.1.2 菌种

创伤弧菌模式株 ATCC 27562 购自中国科学院微生物研究所;创伤弧菌临床分离株 EJ04VV 由福建省疾病预防控制中心提供;用于植板率试验的15株创伤弧菌食品分离株由广东省疾病预防控制中心自食品中分离。

1.1.3 仪器

梯度 PCR 仪,德国 Biometra 公司;Mupid 电泳仪,日本 Advance 公司;GDS-800 凝胶成像系统,美国 UVP 公司。

1.1.4 试剂

改良纤维二糖-多粘菌素 B-多粘菌素 E (mCPC) 琼脂和纤维二糖-多粘菌素 E (CC) 琼脂的制法见 FDA 细菌学分析手册。碱性蛋白胨水、mCPC 和 CC 琼脂基础、纤维二糖、多粘菌素 B、多粘菌素 E、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖 (TCBS) 琼脂、3%氯化钠三糖铁琼脂 (N-TSI)、胰蛋白胨大豆琼脂、胰蛋白胨大豆肉汤、脑心浸液肉汤、细菌微量生化鉴定管和氧化酶试剂购自北京陆桥技术有限责任公司。API 20E 生化鉴定试剂盒为法国生物梅里埃公司产品。TaqDNA 聚合酶、dNTP、100 bp DNA marker 为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 植板率试验

将创伤弧菌菌株接种于3%氯化钠胰蛋白胨大豆肉汤(N-APW), (36±1)℃培养过夜,制备1个麦氏浊度的菌悬液;取0.1 ml 适宜稀释度的菌悬液分别涂布3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(N-TSA)、mCPC、CC 和 TCBS 平板各2块, (36±1)℃培养18~24 h。如果 N-TSA 上菌落数在30~300 CFU(菌落形成单位)之间,则对一组平板进行计数,计算植板率。

1.2.2 染菌试验

1.2.2.1 染菌试样的制备和检测 使用创伤弧菌菌株 EJ04VV 制备1个麦氏浊度的菌悬液。无菌称取25 g 待染菌试样,加入225 ml N-APW,滴入0.1 ml 适当稀释的上述菌悬液,均质后置(36±1)℃增菌12~16 h。增菌液划线接种 mCPC 和 CC 平板,39~40℃

培养18~24 h。典型的创伤弧菌在分离平板上呈圆的、扁平的、中心不透明边缘透明的黄色菌落,直径1~2 mm。每板挑取3个可疑菌落分别接种 N-TSA 平板, (36±1)℃培养18~24 h。采用生化试验或 PCR 法鉴定 N-TSA 平板上的单个菌落^[5]。

1.2.2.2 染菌试样污染水平的检测 染菌实验的当日,同时采用最可能数(MPN)法确定染菌试样中创伤弧菌的实际污染水平。无菌称取50 g 待染菌试样,加入450 ml N-APW,滴入0.2 ml 1.2.2.1 中描述的相同稀释度的菌悬液,增菌、分离、鉴定步骤同1.2.2.1。

1.2.3 天然污染海产品试样的检测

1.2.3.1 定性检测 无菌称取25 g 试样,加入225 ml N-APW,增菌、分离步骤同1.2.2.1。刮取 N-TSA 上的菌苔进行氧化酶试验,阳性菌株穿刺 N-TSI 并进行嗜盐性试验。对于广东、广西试样,将结果符合者进行 PCR 检测,符合创伤弧菌特征者再使用 API 20E 进行确认;对于浙江试样,将结果符合者进行如下生化鉴定:3%氯化钠精氨酸、赖氨酸和鸟氨酸、3%氯化钠 V-P 以及吲哚试验,取 N-TSI 上新鲜培养物进行 ONPG 试验。

1.2.3.2 定量检测 采用 MPN 法确定牡蛎试样中创伤弧菌的实际污染水平。在流水下刷洗牡蛎外壳,无菌操作打开贝壳,称取内容物25 g,加入225 ml N-APW 均质1 min 制成悬液。取装有9 ml N-APW 的试管,接种量分别为0.1、0.01、0.001 和0.0001 g,每个稀释度3管, (36±1)℃增菌12~16 h。增菌液划线接种 CC 平板,39~40℃培养18~24 h。每板挑取3个可疑菌落分别接种 N-TSA 平板, (36±1)℃培养18~24 h。采用 PCR 法鉴定 N-TSA 平板上的单个菌落。查 MPN 表计算创伤弧菌浓度,最低检出限为3 MPN/g。

1.2.4 PCR 法

挑取 N-TSA 上的单个菌落,在3%氯化钠脑心浸液肉汤中37℃培养过夜,制备培养物模板。将微量离心管中1 ml 培养物8 000 r/min 离心5 min。沉淀用生理盐水洗涤2次,重新悬浮于1 ml 双蒸水中,煮沸10 min。模板-20℃保存备用。vvhA 基因引物参照文献,上游5' CCG CGG TAC AGG TTG CGC CA 3',下游5' CGC CAC CCA CTT TCG GGC C 3',扩增片段长519 bp^[5]。PCR 反应体系:20 μmol/L 的上下游引物各1 μl,模板 DNA 2 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,5 U/μl 的 Taq 聚合酶0.3 μl,含 MgCl₂ 的10×缓冲液5 μl,双蒸水39.7 μl。PCR 反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性60 s,62℃退火60 s,72℃延伸60 s,循环25次;72℃再延伸5 min。PCR 产物的琼

脂糖凝胶电泳分析:取 5 μl PCR 产物与 2 μl 6 × 上样胶混合,电泳槽中放入含 1 μg/ml EB 的 1.5 % ~ 1.8 %琼脂糖凝胶,浸入 1 × TBE。常压 5 ~ 10 V/cm,约 45 min。凝胶成像系统照相。

1.2.5 统计分析

数据分析采用 SPSS 11.5 软件。植板率比较采用 Kruskal-Wallis 检验;mCPC 和 CC 平板检出率的比较采用 McNemar 检验。由于 MPN 值标准差的变异较大,因而采用中位数比较不同季节牡蛎试样中创伤弧菌菌量的差异。

2 结果

2.1 植板率的测定

将 17 株创伤弧菌(包括 1 株模式株 ATCC27562,1 株临床分离株和 15 株食品分离株)分别涂布参考培养基及 3 种选择性分离平板。mCPC、CC 和 TCBS 创伤弧菌植板率的均数和标准差分别为 19.6 ± 28.0 %、42.6 ± 44.2 %和 46.7 ± 47.1 %,3 种平板的植板率差异无统计学意义。

2.2 染菌试样的检测结果

两类人工染菌试样创伤弧菌的检出率均为 100 %。对于红明虾试样,mCPC 和 CC 平板的检出率相同,均为 100 %,无污染的对照组未检出创伤弧

菌。对于小黄鱼试样,CC 的检出率高于 mCPC。对于两类人工染菌试样,mCPC 和 CC 检出率的差异均无统计学意义。详见表 1。

表 1 染菌试验的检测结果

海产品类别	加标浓度 (MPN/g)	试样数	生化试验阳性结果		PCR 法阳性结果	
			mCPC	CC	mCPC	CC
红明虾	24	10	10	10	-	- ^a
	2.4	10	10	10	-	-
	<0.03	10	0	0	-	-
小黄鱼	11	10	-	-	9	10
	1.1	10	-	-	7	10

注:“a”为未检测。

2.3 天然海产品试样的监测结果

2.3.1 定性监测

共采集 101 份各类海产品试样,其中浙江 30 份、广东 31 份、广西 40 份;贝类 57 份、甲壳类 20 份、鱼类 24 份。共 20 份(19.8 %)检出创伤弧菌。浙江、广东、广西试样的检出率分别为 6.7 % (2/30)、22.6 % (7/31) 和 27.5 % (11/40)。贝类、甲壳类、鱼类试样的检出率分别为 29.8 % (17/57)、5.0 % (1/20) 和 8.3 % (2/24)。对天然污染海产品试样,mCPC 和 CC 平板检出率的差异无统计学意义。详见表 2。对于广东和广西试样,PCR 法鉴定为创伤弧菌的菌株经 API 20E 鉴定结果也均为创伤弧菌。

表 2 东南沿海地区零售海产品中创伤弧菌的检出情况

地区	海产品类别	试样数	生化试验阳性结果		PCR 法阳性结果		阳性率 (%)
			mCPC	CC	mCPC	CC	
浙江	贝类	7	2	2	-	- ^a	28.6
	甲壳类	10	0	0	-	-	0.0
	鱼类	13	0	0	-	-	0.0
广东	贝类	10	-	-	4	4	40.0
	甲壳类	10	-	-	1	1	10.0
	鱼类	11	-	-	2	2	18.2
广西	贝类	40	-	-	-	11	27.5
合计		101					19.8

注:“a”为未检测。

2.3.2 定量监测 共采集 122 份带壳牡蛎试样,其中浙江 40 份、广东 42 份、广西 40 份。55 份(45.1 %)试样创伤弧菌密度 < 3 MPN/g 的最低检出

限。67 份阳性试样中有 42 份菌量超过 30 MPN/g。冬季试样创伤弧菌菌量中位数 < 3 MPN/g,而其他季节的平均菌量均小于 25 MPN/g。详见表 3。

表 3 不同季节零售带壳牡蛎中创伤弧菌的分布

季节	样本数	试样菌量的百分比						平均菌量 (MPN/g)
		未检出	3~10	> 10~10 ²	> 10 ² ~10 ³	> 10 ³ ~10 ⁴	> 10 ⁴	
冬	32	37.5	9.4	21.9	18.8	12.5	0.0	< 3.0
春	30	33.3	16.7	6.7	20.0	20.0	3.3	23.0
夏	32	62.5	28.1	6.3	3.1	0.0	0.0	13.0
秋	28	46.4	0.0	10.7	32.1	10.7	0.0	11.0
总计	122	45.1	13.9	11.5	18.0	10.7	0.8	3.6

3 讨论

3.1 检测方法

本研究的检测方法修改采用了 FDA 方法,与后者主要区别是将取样量由 50 g 修改为 25 g,以及将样品稀释液由磷酸盐缓冲液修改为 N - APW。

FDA 方法推荐了 mCPC 和 CC 两种平板,在这两种平板上,创伤弧菌因发酵纤维二糖产生带黄色晕环的黄色菌落;霍乱弧菌不发酵纤维二糖,产生带蓝色晕环的紫色菌落,其他弧菌不生长。本研究发现,mCPC 和 CC 平板的创伤弧菌植板率差异无统计学

意义;而且不论是人工染菌试样还是天然污染海产品试样,两种平板的创伤弧菌检出率差异均无统计学意义,提示这两种培养基均适用于海产品创伤弧菌的分离。TCBS 琼脂是 NMKL、加拿大和日本检验方法中推荐的创伤弧菌分离培养基^[4,6,7]。然而有研究显示,TCBS 在用于环境调查时其选择性存在问题,其上分离菌株仅 51 %为弧菌;与非选择性培养基上弧菌的生长相比,TCBS 会降低弧菌的回收率^[10]。HØI 等^[11]发现,mCPC 和 CC 平板创伤弧菌(50 株)回收率差异无统计学意义,但 TCBS 的回收率显著低于上述琼脂;将海水或海底底泥样品的增菌液直接涂布 mCPC 和 CC 平板,寡核苷酸探针克隆杂交显示,两种平板上均有 95 %以上的可疑菌落为创伤弧菌。本研究发现,采用 N - APW 作为选择性增菌液,mCPC 和 CC 琼脂作为选择性分离培养基,对于两类海产品的不同染菌水平,方法的检出率均为 100 %,提示方法具有可行性。本研究未对方法的检出限作更深入的探索,理论上说,方法的灵敏度为 25 g 样品中检出 1 个菌,相当于 0.04 CFU/g。

3.2 海产品污染状况 本研究结果表明,东南沿海地区零售海产品创伤弧菌检出率约为 20 %,不同地区贝类创伤弧菌检出率约为 30 %~40 %。同期研究中,福建人员采用 VITEK 系统鉴定海产品中分离的可疑菌株,结果表明 11 % (4/36) 的试样菌量 ≥ 3 MPN/g。印度科钦地区海产品创伤弧菌的检出率为 14 %;YANO 等的研究显示,中国零售海产品创伤弧菌检出率为 33 %^[12,13]。本研究中,约 55 %的牡蛎试样污染菌量 ≥ 3 MPN/g,CHAN 等报告香港地区牡蛎检出率为 6 %,而 COOK 等报告美国牡蛎检出率为 9.6 %~95.2 %^[14,15]。多种原因造成不同研究获得的检出率不同,比如,水体环境中创伤弧菌的污染状况、海产品的卫生状况、检测方法等等。

牡蛎是一种滤食性动物,容易在其体内富集周围环境中的致病菌。FAO/WHO 公布的《生食牡蛎创伤弧菌风险评估》报告中指出:如果创伤弧菌浓度为 3 个/g 或 30 个/g,风险会明显降低^[16]。美国州际贝类卫生委员会 (ISSC) 规定,收获后经处理的牡蛎中创伤弧菌限量不超过 30 CFU/g^[17]。本研究结果表明,34 %的试样污染菌量 ≥ 30 MPN/g,提示我国沿海地区零售带壳牡蛎存在比较严重的创伤弧菌污染。本研究中,温暖季节创伤弧菌的检出率和检出水平较高,与国外研究结果一致,提示应当在温暖季节加强对海产品创伤弧菌的监测^[18]。

总而言之,采用 N - APW 增菌,mCPC 和 CC 平板

分离的方法适用于海产品中创伤弧菌的检测。本研究为将来开展全国性的海产品中创伤弧菌的监测,全面了解我国海产品中创伤弧菌的污染状况奠定了基础。由于海产品中创伤弧菌的污染较为严重,未来有必要开展分离株的分子分型研究及耐药监测,以便增强公共卫生部门应对突发公共卫生事件的能力。

参考文献

- [1] BISHARAT N, COHEN D I, HARDING R M, et al. Hybrid *Vibrio vulnificus* [J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(1): 30-35.
- [2] QULIG, P A, BOURDAGE K L, STARKS A M. Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus* [J]. J Microbiol, 2005, 43 Spec No: 118-131.
- [3] 卢中秋,李秉熙,黄唯佳,等. 创伤弧菌败血症的临床和流行病学特点 [J]. 中国急救医学, 2003, 23(7): 470-471.
- [4] NMKL method No. 156/Pathogenic *Vibrio* species detection and enumeration in foods [S]. 2nd edition. 1997.
- [5] KAYSNER C A, DEPAOLA A Jr. *Vibrio* [M/OL]//Bacteriological Analytical Manual Online. [2004-05]. USFDA. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bamr9.html>.
- [6] STAVRIC S, BUCHANAN B. The isolation and enumeration of *Vibrio vulnificus* from fish and seafoods [S/OL]. [1995-04]. http://www.hc-sc.gc.ca/frr-an/alt-formats/hpfrb-dggsa/pdf/res-rech/mflp73_e.pdf.
- [7] 日本厚生劳动省. 食品卫生检查指针 - 微生物编 [M]. 日本: 社团法人日本食品卫生协会, 2004: 201-224.
- [8] 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验 [S]. GB/T 4789.7 — 2008. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [9] 陈炳卿,刘志诚,王茂起. 现代食品卫生学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 782.
- [10] HARWOOD V J, GANDHI J P, WRIGHT A C. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review [J]. J Microbiol Methods, 2004, 59 (3): 301-316.
- [11] HØI L, DALSGAARD I, DALSGAARD A. Improved isolation of *Vibrio vulnificus* from seawater and sediment with cellobiose-colistin agar [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(5): 1721-1724.
- [12] THAMPURAN, N, SURENDRAN P K. Occurrence and distribution of *Vibrio vulnificus* in tropical fish and shellfish from Cochin (India) [J]. Lett Appl Microbiol, 1998, 26(2): 110-112.
- [13] YANO Y, YOKOYAMA M, SATOMI M, et al. Occurrence of *Vibrio vulnificus* in fish and shellfish available from markets in China [J]. J Food Prot, 2004, 67(8): 1617-1623.
- [14] CHAN K Y, WOO M L, LAM L Y, et al. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong [J]. J Appl Bacteriol, 1989, 66(1): 57-64.
- [15] COOK D W, OLEARY P, HUNSUCKER J C, et al. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999 [J]. J Food Prot, 2002, 65(1): 79-87.
- [16] FAO/WHO. Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: interpretative summary and technical report. MRA series 8 [R/OL]. 2005. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra8.pdf>.
- [17] PANICKER G, BEI A K. Real-time PCR detection of *Vibrio vulnificus* in oysters: comparison of oligonucleotide primers and probes targeting *whA* [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 5702-5709.
- [18] MOTES M L, DEPAOLA A, COOK D W, et al. Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(4): 1459-1465.

[收稿日期:2009-04-01]

文章编号:1004-8456(2009)04-0344-04

文献标识码:A

中图分类号:R378.3; R155.31; TS201.3