

论著

2006 - 2008 年广东省水产品 and 食物中毒患者 副溶血性弧菌分离株血清分型研究

方伟^{1,2} 黎微¹ 柯昌文¹ 马聪¹ 朱海明¹ 宋曼丹¹ 何冬梅¹ 杨冰¹
王海燕¹ 赖蔚蓉¹ 王建¹ 严纪文¹ 邓小玲¹ 杨杏芬¹

(1. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300;
2. 暨南大学医学院流行病学教研室, 广东 广州 510632)

摘要:目的 研究 2006 - 2008 年广东地区副溶血性弧菌食物中毒患者分离株和水产品分离株的血清型分布。方法 采用血清玻片凝集试验对 2006 - 2008 年我中心收集的 279 株副溶血性弧菌进行血清分型, 这些菌株均由广东省食品污染物监测网和省食源性致病菌监测网分离获得, 分离地区覆盖广东的粤西、粤北、粤东和珠三角地区, 其中食物中毒患者分离株 176 株, 水产品分离株 103 株。结果 2006 - 2008 年收集的 279 株副溶血性弧菌中, 在 176 株食物中毒患者分离株中完全分型 168 株, 分型率为 95.45%, 共分出 15 个血清型, 以 O3:K6 为主, 占 73.30% (129/176); 在 103 株水产品分离株中完全分型 57 株, 分型率为 55.34%, 其血清型别分布较分散, 未见优势菌型, 共分出 40 个血清型, 主要集中在 O1, O2, O3, O4, O5, O10, O11 等 7 个菌群。结论 2006 - 2008 年广东各地区上送的副溶血性弧菌食物中毒患者分离株以 O3:K6 为主, 血清型地区差异不明显; 水产品分离株血清型呈多样性, 且与食物中毒患者分离株的血清型不一致。

关键词:弧菌, 副溶血性; 分离和提纯; 食物中毒; 微生物学; 血清分型

Serotype of *Vibrio Parahaemolyticus* Isolated from Food-Poisoning Patients and Aquatic Products in Guangdong Province in 2006—2008

FANG Wei, LI Wei, KE Chang-wen, MA Cong, ZHU Hai-ming, SONG Man-dan, HE Dong-mei, YANG Bing, WANG Hai-yan, LAI Wei-dong, WANG Jian, YAN Ji-wen, DENG Xiao-ling, YANG Xing-feng
(Guangdong Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Objective To research the serotype distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food-poisoning patients and aquatic products in 2006 - 2008 in Guangdong Province. **Method** Slide serum agglutination test was used to detect the serotype of 279 *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from food-poisoning patients and aquatic products. These strains were collected and isolated under the instruction of Guangdong Surveillance network on food borne diseases and food contamination from the regions covering western Guangdong, northern Guangdong, eastern Guangdong and the Pearl River Delta areas, including 176 food-poisoning isolates and 103 aquatic products isolates. **Results** In (279 strains of *Vibrio parahaemolyticus* collected in 2006 - 2008, 15 serotypes were identified for 168 of 176 strains isolated from food-poisoning patients, the total typing-rate was 95.45%, and the main serotype was O3: K6, accounting for 73.30% (129/176); In 103 isolates of aquatic products, 40 serotype in 57 strains were typed, mainly centralized on seven serum groups: O1, O2, O3, O4, O5, O10, O11, with no popular type, and the total typing-rate was 55.34%. **Conclusion** The main serotype of *Vibrio parahaemolyticus* from food-poisoning strains in Guangdong Province was O3: K6, the regional difference was not significant. The serotype of isolates from aquatic products was diversity, and they were different from the serotype of food poisoning strains.

Key words: *Vibrio Parahaemolyticus*; Isolation & Purification; Food Poisoning; Microbiology; Serotyping

自 1998 年以来,我国细菌性食物中毒的病原构成发生了显著的变化,在沿海省份副溶血性弧菌 (*vibrio parahaemolyticus*, VP) 引起的食物中毒已高居

细菌性食物中毒的首位^[1]。2003 - 2005 年我们分别在广东省的湛江、汕头、深圳及广州地区的水产品零售市场和餐饮店,按无菌操作采集虾类、鱼类、贝壳类、蟹类、软体类水产品 431 份,156 份检出 VP,总检出率为 36.19%,表明我省水产品受 VP 污染严重,而我省 VP 引起的食物中毒近年也呈上升的趋势^[2]。为了解我省 VP 的血清型分布及水产品 VP

基金项目:广东省自然科学基金(Y092006B6)
作者简介:方伟 女 硕士生
通讯作者:杨杏芬 女 教授

分离株和食物中毒患者 VP 分离株之间的联系,我们对 2006 - 2008 年收集的 VP 分离株进行了血清分型,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

279 株 VP 分离株均来自于广东省疾病预防控制中心菌毒种保存库,从 2006 - 2008 年全省食品污染物监测网和省食源性致病菌监测网分离获得,监测点涵盖广州、深圳、珠海、佛山、东莞、中山、惠州、汕头、清远、韶关、湛江、江门、肇庆、增城、惠东、清新、河源、阳东、始兴等 19 个地区。其中食物中毒患者分离株来自 2006 - 2008 年 VP 中毒病人的肛拭、粪便标本,共 176 株,3 年分别为 23、111、42 株;水产品分离株来自海虾、淡水虾、海鱼、淡水鱼、贝壳类水产品(牡蛎、海螺、蚌、蛤)、蟹、软体类水产品(章鱼、鱿鱼、墨鱼)和生食的海鱼(三文鱼、吞拿鱼)等 8 类水产品,共 103 株,3 年分别为 27、49、27 株。

1.2 分型血清

副溶血性弧菌鉴定血清购自日本生研株式会社,包括 O 抗原 O1 ~ O11 群, K 抗原 K1 ~ K71 型(其中缺 K2、K14、K16、K27、K35、K62,实际为 65 个 K 血清型)。

1.3 培养基

3.5 % NaCl 结晶紫增菌液,硫代硫酸盐 - 柠檬酸盐 - 胆盐 - 蔗糖琼脂 (TCBS), 3 % NaCl 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA), 均购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.4 分型方法

1.4.1 复苏菌种 用 3.5 % NaCl 结晶紫增菌液复苏 VP, 37 °C 培养 18 ~ 24 h, 接种 TCBS 培养基, 37 °C 培养 18 ~ 24 h, 挑取绿色单菌落接种 3 % NaCl TSA 斜面, 37 °C 培养 18 ~ 24 h。

1.4.2 K 抗原检测 取 TSA 斜面培养物做玻片凝

集实验。用蜡笔在一张玻片上划出适当数量的间隔,先滴加多价 K 抗血清,与菌苔磨匀,出现凝集后再用对应的单价抗血清进行检测。阳性凝集反应可立即观察到。如与多价 K 血清均不凝集,取菌苔溶于 0.5 ml 3 % NaCl 制成菌悬液,与 0.5 ml 0.2 % 盐酸等体积混合,室温静置 30 min。4 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,用 3 % NaCl 溶液重悬菌体,重复操作 1 次,用处理后的菌悬液重新进行 K 抗原检测,如仍为阴性,则培养物 K 抗原属于未知。用 3 % NaCl 做自凝对照。

1.3.3 O 抗原检测 取菌苔与含 3 % NaCl 的 5 % 甘油溶液混匀制成菌悬液,121 °C 灭菌 1 h,以破坏 K 抗原,灭菌后 4 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用 3 % NaCl 溶液重悬菌体。用蜡笔在一张玻片上划出适当数量的间隔,滴加 1 滴 O 群血清,再滴加一滴菌悬液混匀,阳性凝集反应可立即观察到。如与 O 群血清均不凝集,将菌悬液再次 121 °C 高压 1 h 后重新检测。如仍为阴性,则培养物的 O 抗原属于未知。用 3 % NaCl 做自凝对照。

2 结果

2.1 2006 - 2008 年广东省不同年代食物中毒患者 VP 分离株血清型分布

在 2006 - 2008 年收集的 176 株 VP 食物中毒患者分离株中完全分型 168 株,分型率 95.45 %,共分出 15 个血清型,主要集中在 O1、O2、O3、O4、O5、O8、O10 共 7 个血清群,以 O3:K6 为主,占 73.30 % (129/176),其次为 O4:K8,占 11.93 % (21/176)。2008 年 O4:K8 有上升趋势,构成比分别从 2006 年和 2007 年的 17.39 % 和 5.41 % 上升至 26.19 %;O2:K3 型 VP 在 2006 年和 2007 年均未分离到,而 2008 年此型 VP 构成比达 16.67 % (7/42),分型结果详见表 1。

表 1 2006 - 2008 年广东省食物中毒患者 VP 分离株血清型分布

血清型	2006 年		2007 年		2008 年		合计 (%)	
	菌株数 (株)	%	菌株数 (株)	%	菌株数 (株)	%		
O1	K36		1	0.90			1(0.57)	
	K38		2	1.80			2(1.13)	
	K56	1	4.35				1(0.57)	
	K1T	3	13.04	3	2.70	1	2.38	7(3.97)
O2	K3				7	16.67	7(3.97)	
O3	K4	1	4.35				1(0.57)	
	K6	11	47.82	96	86.49	22	52.38	129(73.30)
	K29	1	4.35				1(0.57)	
O4	K8	4	17.39	6	5.41	11	26.19	21(11.93)
O5	K17				1	2.38	1(0.57)	
	K68			1	0.90		1(0.57)	
O8	K41	1	4.35				1(0.57)	
O10	K24	1	4.35				1(0.57)	
	K71			1	0.90		1(0.57)	
	K1T			1	0.90		1(0.57)	
合计	23	100	111	100	42	100	176	

2.2 2006 - 2008 年广东省不同地区食物中毒患者 VP 分离株血清型分布

2006 - 2008 年东莞、湛江、肇庆、汕头四地食物中毒患者 VP 分离株均以 O3:K6 为主,构成比分别为:73.96% (71/96)、77.36% (41/53)、66.67% (12/18)、83.33% (5/6),其次为 O4:K8,血清型的地区差异并不明显。

2.3 2006 - 2008 年广东省水产品 VP 分离株血清型分布

2006 - 2008 年采样海虾、淡水虾、海鱼、淡水鱼、贝壳类水产品(牡蛎、海螺、蚌、蛤)、蟹、软体类水产品(章鱼、鱿鱼、墨鱼)和生食的海鱼(三文鱼、吞拿鱼)等 8 类水产品,共收集上送水产品 VP 分离株 103 株,3 年各为 27、49、27 株,其分型率为 55.34% (57/103),散在分布于 40 个血清型,主要集中在 O1、O2、O3、O4、O5、O10、O11 7 个菌群,以 O1 群为主,未检出 O3:K6 型。不同年份 VP 优势群略有差异,2006 年以 O1、O2、O3 群为主,2007 年以 O1、O4、O3 群为主,2008 年以 O1、O5、O2 群为主,具体见图 1。

2.3.1 2006 - 2008 年广东省不同地区水产品 VP 分

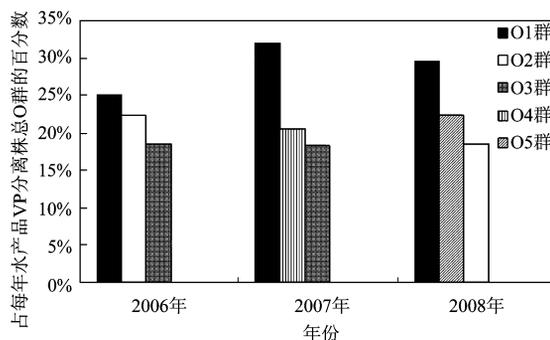


图 1 广东省 2006 - 2008 年抽样的水产品 VP 分离株前三位菌群分布图

离株血清型分布 源自水产品的 103 株 VP 来自 2006 - 2008 年广东省食品污染物监测网水产品检测分离所得,该网络覆盖了广东省的东、南、西、北部,山区、平原和沿海地区。实验结果显示,广东省 2006 - 2008 年不同地区水产品 VP 分离株血清型较多且型别分散,主要集中在 O1、O2、O3、O4、O5、O10、O11 群。各地水产品 VP 分离株血清型分布见表 2,占前三位的菌群分布见图 2。

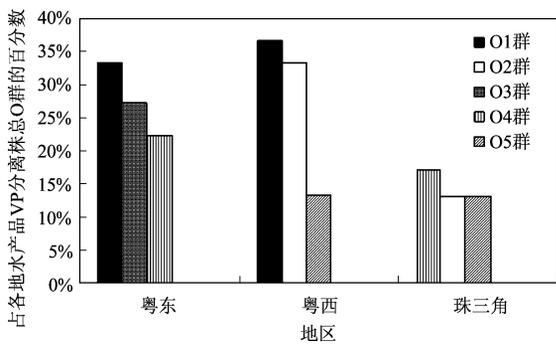
表 2 2006 - 2008 年广东省不同地区抽样的水产品 VP 分离株血清型分布

地区	株数	血清型(株数)								型数
粤东	18	O1: K1 (1)	O2: KUT(1)	O3: K20(1)	O4: K34(1)	O5: K17(1)	O10: K24(1)			14
		O1: K33(1)		O3: K58(1)	O4: KUT(2)		O10: KUT(1)			
		O1: K38(1)		O3: KUT(3)						
		O1: K1V(1)								
		O1: KUT(2)								
粤北	2	O2: K28(1)	O5: K17(1)						2	
粤西	30	O1: K3*(1)	O2: K3(4)	O3: K48(1)	O4: K11(1)	O5: K17(3)	O11: KUT(1)			18
		O1: K9(1)	O2: K28(2)		O4: K12(1)	O5: KUT(1)				
		O1: K17*(1)	O2: KUT(5)		O4: KUT(1)					
		O1: K24(1)								
		O1: K33(1)								
		O1: K45*(1)								
		O1: K48(1)								
		O1: KUT(3)								
珠三角	53	O1: K1(1)	O2: K28(3)	O3: K4(1)	O4: K9(2)	O5: K15(1)	O10: K24(1)	O11: KUT(3)	OUT: K24(1)	26
		O1: K18*(1)	O2: KUT(4)	O3: K5(1)	O4: K34(1)	O5: K17(4)	O10: KUT(2)	OUT: KIX(1)		
		O1: K19*(1)		O3: K(1)	O4: K42(2)	O5: KUT(2)				
		O1: K32(2)		O3: KUT(3)	O4: K49(1)					
		O1: K34(1)			O4: KUT(3)					
		O1: K36*(1)								
		O1: KUT(9)								
合计	103									40

注:“*”表示该菌为新菌型。

2.3.2 2006 - 2008 年广东省不同类别水产品 VP 分离株血清型分布 103 株水产品 VP 分离株中,有详细水产品来源信息的 83 株。经检测 83 株 VP 共分出 36 个血清型,集中在 O1、O2、O3、O4、O5、O10、O11 群。鱼分离的 48 株 VP 以 O1 群较多,占 27.08% (13/48),无优势血清型,而 O5 群和 O2 群主要集中

为 O5:K17、O2:K3 和 O2:K28 型。贝类分离的 25 株 VP 以 O4 群较多,占 36.00% (9/25),主要集中在 O4:K9、O4:K12 等 6 个血清型。从鱼、虾、贝类和蟹类等不同水产品中分离的 VP 菌株血清型呈多样化,具体分型结果见表 3,占前三位的菌群分布见图 3。



粤北地区仅上送两株 VP 水产品分离株。

图 2 2006 - 2008 年广东省不同地区抽样的水产品 VP 分离株血清型前三位菌群分布图

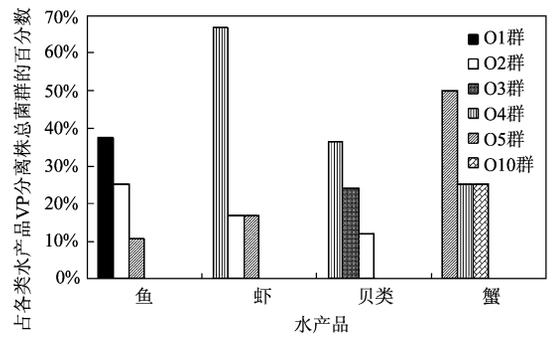


图 3 2006 - 2008 年广东地区抽样的不同类别水产品 VP 分离株血清型前三位菌群分布图

表 3 2006 - 2008 年广东地区抽样的不同类别水产品 VP 分离株血清型分布

水产品	株数	血清型(株数)								型数		
鱼	48	O1: K1 (2)	O2: K3 (4)	O3: K20 (1)	O4: K11 (1)	O5: K17 (5)	O10: KUT (2)	O11: KUT (1)	OUT: K24 (1)	25		
		O1: K3* (1)	O2: K28 (3)	O3: K1V (1)	O4: K34 (1)							
		O1: K9 (1)	O2: KUT (5)	O3: KUT (2)	O4: K42 (1)							
		O1: K18* (1)			O4: KUT (1)							
		O1: K24 (1)										
		O1: K32 (2)										
		O1: K33 (2)										
		O1: K38 (1)										
		O1: K48 (1)										
		O1: K1V (1)										
		O1: KUT (6)										
		虾	6	O1: K45* (1)	O2: K3 (1)	O5: K15 (1)						5
				O1: K17* (1)								
O1: KUT (2)												
贝类	25	O1: K34 (1)	O2: KUT (3)	O3: K4 (1)	O4: K9 (1)	O5: K17 (1)	O10: K24 (1)	O11: KUT (2)	17			
		O1: KUT (1)		O3: K48 (1)	O4: K12 (1)	O5: KUT (1)						
		O3: K58 (1)	O4: K34 (1)									
		O3: KUT (3)	O4: K42 (1)									
		O4: K49 (1)										
蟹类	4	O4: KUT (1)	O5: K17 (2)	O10: K24 (1)					3			
合计	83									36		

注：“*”表示该菌为新菌型。

2.4 副溶血性弧菌新菌型

2006 - 2008 年中,103 株水产品 VP 分离株有 6 株 (5.82%) 的血清型属于新菌型,均为 O1 群,分别为 O1: K3, O1: K17, O1: K18, O1: K19, O1: K36, O1: K45; 176 株食物中毒患者分离株未见新型别。

3 讨论

副溶血性弧菌是沿海地区引起食物中毒和急性腹泻的主要病原菌,它的抗原构造极为复杂,查明人群与外环境中 VP 菌型分布情况及其内在联系,对该病的防治研究具有重要意义。资料显示,近年世界流行的 VP 血清型发生较大变化,一种新的 O3: K6 血清型被认为是 20 世纪 90 年代末形成全球大流行的型别^[3,4]。O3: K6 血清型最早出现在 1996 年

印度的加尔各答,随后这些在印度流行的菌群很快蔓延到其他国家^[5-7],目前这种 O3: K6 株的高感染频率和蔓延能力已引起各国的高度关注。我国各地研究也证实 O3: K6 型 VP 也是导致我国某些地区 VP 感染的优势株^[8,9]。

本次血清分型食物中毒患者 VP 分离株分型率达到 95.45%,而水产品中 VP 分型率较低,仅达 55.34%,与其他研究结果类似^[10]。其中水产品 VP 分离株共有 3 株 VP 的 K 混合多价凝集,但是单价不能定型,1 株 O 未定型。这种现象一方面提示 VP 血清型的多样性,尤其是水产品分离株,可能存在一些新的 O、K 抗原^[9];另一方面也说明目前我们使用的这套鉴定血清比较局限,有待进一步改进。

研究发现水产品中检测的菌株与食物中毒患者

分离株的血清型并不一致。食物中毒患者分离株以 O3:K6 为主,而水产品 VP 分离株未分离到 O3:K6 型,与国内外其他研究结果类似^[8,9,11]。我们分离得到的水产品 VP 以 O1 群为主,O1:K38 和 O1:KUT 型同时也在食物中毒患者中分离到。不同于 2006 年和 2007 年,2008 年食物中毒患者分离到 O2:K3、O5:K17 型 VP,分别占 16.67% (7/42) 和 2.38% (1/42),鱼、虾、贝类和蟹类等水产品中也分离到此型 VP,因此我们仍要加强水产品监测。2008 年上半年对广东省部分地区发生的 5 起由 VP 引起的食物中毒 VP 分离株进行检测分析,发现主要由 O3:K6 型引起,而同时送检的可疑食品 VP 分离株血清型为 O2:K28,O2:KUT,O5:KUT,O10:KUT,O11:KUT,未分离到 O3:K6 型,推测送检可疑食品并非引起 VP 食物中毒的原因食品,提示发生中毒事件时应尽最大可能采集有价值的标本,对需要检测的标本,应由流行病学专业人员和检验人员共同商讨采样计划进行采集。

通过研究我们初步了解了广东省水产品和食物中毒患者中 VP 的血清型分布,由于 VP 的致病性与菌株的毒力基因有关,今后我们将在 VP 血清分型的基础上进一步做毒力基因检测,并结合血清分型共同分析,以了解广东省 VP 分离株的毒力基因特征,以及与血清型的关系,为流行病学预测预警提供更有力实验室资料。

参考文献

- [1] 刘秀梅. 食源性疾病监控技术的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(1): 3-9.
[2] 严纪文, 马聪, 朱海明, 等. 2003-2005 年广东省水产品中副溶血

性弧菌的主动监测及其基因指纹图谱库的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(4): 387-391.

- [3] OKUDA J, ISHIBASHI M, HAYAKAWA E, et al. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3150-3155.
[4] BAG PK, NANDI S, BHADRA RK, et al. Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(7): 2354-2357.
[5] CHOWDHURY A, ISHIBASHI M, THIEM VD, et al. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999[J]. Microbiol Immunol, 2004, 48(4): 319-327.
[6] CHIOU CS, HSU SY, CHIU SI, et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4621-4625.
[7] WONG HC, LIU SH, KU LW, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan[J]. Journal of Food Protection, 2000, 63(7): 900-906.
[8] 张蔚, 潘劲草, 孟冬梅, 等. 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, 4(27): 343-346.
[9] 黄锐敏, 陈辉, 袁月明. 2004 - 2006 年深圳南山区副溶血性弧菌菌群型分布及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1275-1335.
[10] 程苏云, 翁景清, 林香娟, 等. 副溶血性弧菌食物中毒菌株的血清型耐药性及基因检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(2): 141-142.
[11] TAKAHIRO TOMOYASU. Development of the Immunomagnetic Enrichment Method Selective for *Vibrio parahaemolyticus* Serotype K and Its Application to Food Poisoning Study[J]. Applied and environmental microbiology, 1992, 58(8): 2679-2682.

[收稿日期: 2009 - 03 - 10]

中图分类号: R378.3; R155.31; TS201.3 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2009)04 - 0352 - 05

卫生部监督局关于含菊粉食品标识有关问题的批复

卫监督食便函〔2009〕209号

中国乳制品工业协会:

你协会《关于对使用菊粉的食品标签标示的请示》(中乳协〔2009〕45号)收悉。经研究,批复如下:

一、新资源食品菊粉是以菊苣为原料,去除蛋白质和矿物质后,经喷雾干燥等步骤获得,每日食用量应不大于 15 克,可用于各类食品,但不包括婴幼儿食品。

二、使用新资源食品菊粉为原料生产食品,必须按照《新资源食品管理办法》和卫生部公告的要求使用新资源原料,其产品标签应当符合国家有关规定,但无需按照对新资源食品菊粉的要求标注使用范围。

此复。

中华人民共和国卫生部

二 九年七月一日