

不同来源的副溶血性弧菌生物学特性研究

程苏云<sup>1</sup> 李恩民<sup>2</sup> 张俊彦<sup>1</sup> 朱 敏<sup>1</sup> 梅玲玲<sup>1</sup>

(1. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310009; 2. 桂林医学院, 广西 桂林 541004)

**摘 要:**为掌握浙江省不同来源的副溶血性弧菌的血清型分布及毒力基因携带情况,采用血清凝集试验对 333 株副溶血性弧菌进行血清型分型,采用 PCR 技术检测副溶血性弧菌的毒力基因 TDH。临床副溶血性弧菌菌株血清型分布于 7 个 O 抗原群,以 O3 为主,占临床菌株数的 71.81 %; O4 血清型与往年相比有所上升,占到了 16.60 %。海产品菌株的血清型分布于 8 个 O 抗原群,以 O5 为主,占有海产品菌株的 47.30 %。临床菌株的 TDH 检出率为 95.65 %,海产品菌株的 TDH 检出率为 6.06 %。血清型相同但来源不同的菌株的 TDH 检出率不同。浙江省从海产品中分离出的副溶血性弧菌菌株与分离自食源性疾病患者的副溶血性弧菌菌株的主要血清型、毒力基因 TDH 都存在差别。该工作为预防副溶血性弧菌引起的食物中毒提供了科学依据。  
**关键词:**弧菌;副溶血性;生物学;基因;食品微生物学

Biologic Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from Different Sources

CHENG Su-yun, LI En-min, ZHANG Jun-yan, ZHU Min, MEI Ling-ling

(Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310009, China)

**Abstract:** To understand the serotype and the virulent genotype of the *Vibrio parahaemolyticus* isolated from different sources in Zhejiang Province, the serotype was tested by serum agglutination; PCR technology was applied to measure the TDH (thermostable directs hemolysin) virulence gene. It was found that the serotypes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from clinical patients were distributed in 7 O-antigen groups. Among them, O3 was the dominating type with 71.81 % prevalence in the isolations from clinical patients, and the proportion of O4 type rose to some extent accounting for 16.60 % compared with last year. The serotype in strains isolated from seafoods distributed in 8 O-antigen groups, in which the O5 type prevailed (47.30 %). It was demonstrated that the virulence gene TDH could be detected to be 95.65 % in clinical isolations employing the PCR technology. In contrast, there was only 6.06 % TDH positive rate in strains isolated from seafoods. Moreover, the TDH positive rate varied with the source of the bacteria despite of sharing the same serotype. There was difference in serotype and genotype of TDH between *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seafoods and from patients suffering from foodborn disease.

**Key word:** *Vibrio parahaemolyticus*; Biology; Genes; Food Microbiology

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP 以下简称为副溶菌) 是一种嗜盐性细菌,主要分布于沿岸海水、海河交界处及海产品中,是沿海地区引起食物中毒的主要病原菌。副溶菌在浙江省的细菌性食物中毒中也是主要的病原菌,1983 年~1992 年在调查确诊病原因子食物中毒中,有 29 % 为副溶菌引起的食物中毒<sup>[1]</sup>。近年来,副溶菌引起的食物中毒的发生率呈上升趋势。副溶菌的主要致病因子是耐热的直接溶血毒素 (thermostable direct hemolysin, TDH)。本文对浙江省 2004 年从不同来源分离到的 333 株菌株进行血清分型和毒力基因 TDH 检测,以便为本省副溶菌引起的食物中毒进行有效的控制和快速诊断提供依据。

作者简介:程苏云 女 副主任技师

1 材料与方法

1.1 菌株来源 海产品菌株来源于自舟山市农贸市场采集的鱼、虾等海产品中分离的菌株,共 74 株;暴发型食物中毒菌株来源于自上城区、湖州、台州等地区的 5 起食物中毒病人排泄物(粪便)样本中分离的菌株,共 25 株;临床散发型菌株来源于自临床病人排泄物(粪便、呕吐物等)标本分离的菌株,共 234 株。  
1.2 试剂和仪器 副溶菌诊断血清,日本生研株式会社 DENKA;副溶菌毒力基因 TDH 检测试剂盒,上海宝生科技发展有限公司;PCR 仪,德国“eppendorf”公司。  
1.3 血清分型方法 按卫生防疫细菌手册<sup>[2]</sup>及细菌检验分析手册<sup>[3]</sup>中有关方法进行。取单个菌落接种于 3.5 % NaCl 胰蛋白胨斜面,37 °C 培养 24 h,用 3 % 盐水洗下斜面上的细菌,将菌液高压 1~2 h 灭菌。然后 7 000 r/min 离心 4 min,弃上清,用 1 % 盐水清洗,然后 7 000 r/min 离心 4 min,重复 2~3 次,挑

取少许沉淀物作玻片凝集试验。

1.4 副溶菌毒力基因检测

1.4.1 模板的制备 取增菌液 100 μl,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 100 μl DNA 提取液入沉淀中,振荡混匀。置 100 °C水浴加热 10~15 min。10 000 r/min 离心 1 min,保留上清待用。

1.4.2 PCR 反应 21 μl PCR 反应体系含 Tris-HCl、Taq 酶、引物、dNTP 及模板 DNA,反应程序为预变性 94 °C5 min,然后按 94 °C30 s、56 °C40 s、72 °C90 s 循环 35 次,最后 72 °C延长 3 min。

1.4.3 PCR 产物检测 PCR 产物检测用含 0.5 μg/ml溴化乙锭的 2 %琼脂糖凝胶电泳,PCR 扩增产物为 382 bp,以 67~501 bp 的 Marker 作对照,紫外灯

下观察实验结果是否有毒力基因 TDH 的扩增片段。

2 结果

2.1 副溶血性弧菌血清分型结果 对收集的 333 株副溶血性弧菌进行血清(群)分型,其结果如表 1 所示。由表 1 可见,临床副溶菌株的主要血清群为 O3、O4 和 O1,3 者之和占临床菌株数的 96.52 %,其中 O3 血清群占临床检测菌株的 71.81 %;暴发型临床菌株中,O3 占 72.00 %,O4 占 20.00 %;散发型临床菌株中,O3 占 71.79 %,O4 占 16.24 %;海产品副溶菌株的主要血清群则集中在 O5、O4、O2 和 O1 中,这 4 者之和占总海产品菌株的 87.83 %,O5 为最主要的血清群,占到了检测海产品菌株的 47.30 %。

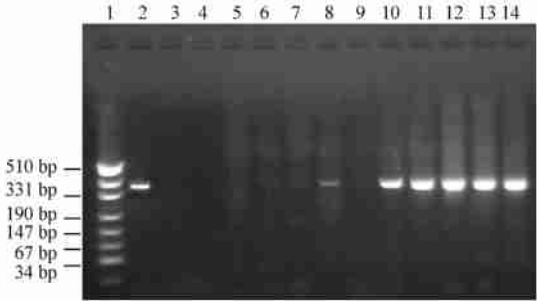
表 1 333 株副溶血性弧菌血清群分布情况

| 来源   | 株数  | 血 清 型 别 |    |     |    |    |    |     |
|------|-----|---------|----|-----|----|----|----|-----|
|      |     | O1      | O2 | O3  | O4 | O5 | O8 | O10 |
| 临床暴发 | 25  | 1       | 0  | 18  | 5  | 1  | 0  | 0   |
| 临床散发 | 234 | 20      | 1  | 168 | 38 | 5  | 1  | 0   |
| 海产品  | 74  | 8       | 11 | 3   | 11 | 35 | 1  | 1   |
| 合计   | 333 | 29      | 12 | 189 | 54 | 41 | 2  | 1   |

2.2 副溶菌毒力基因 TDH 检测结果 对 79 株不同来源的副溶菌株进行了 TDH 基因的 PCR 检测(表 2、图 1),46 株临床菌株中有 44 株被检出含有 TDH 基因,并且扩增条带亮度很高,检出率高达 95.65 %,其中暴发型菌株和散发型菌株的 TDH 检出率分别为 96.00 %和 95.24 %,差异无显著性( $P < 0.05$ )。对 33 株海产品菌株的 TDH 检测发现,只有 2 株副溶菌扩增出阳性条带,且亮度很低,检出率只有 6.06 %。从表 2 中还可发现,血清型相同但来源不同的副溶菌株,其 TDH 基因的检出率是不同的,对 21 株血清型 O3 临床菌株进行检测,只有 1 株没有检出 TDH 基因;对 3 株 O3 血清型的海产品菌株进行 TDH 基因检测,没有扩增出阳性条带。对于同样是 O4 血清型的菌株,临床菌株 TDH 检出率是 90.0 %,而海产品菌株的检出率只有 16.67 %。4 株血清型为 O5 的临床菌株都被检出携带 TDH 基因,24 株 O5 血清型的海产品菌株只有 1 株被检出携带 TDH 基因。

表 2 79 株副溶血性弧菌的 TDH 基因检测结果

| 来源   | 株数 | TDH   | O1 | O3 | O4 | O5 | 合计 |
|------|----|-------|----|----|----|----|----|
| 临床暴发 | 25 | TDH + | 1  | 17 | 5  | 1  | 24 |
|      |    | TDH - | 0  | 1  | 0  | 0  | 1  |
| 临床散发 | 21 | TDH + | 0  | 13 | 4  | 3  | 20 |
|      |    | TDH - | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  |
| 海产品  | 33 | TDH + | 0  | 0  | 1  | 1  | 2  |
|      |    | TDH - | 0  | 3  | 5  | 23 | 31 |
| 合计   | 79 | TDH + | 1  | 30 | 10 | 5  | 46 |
|      |    | TDH - | 0  | 4  | 6  | 23 | 33 |



1. DNA Marker; 2. TDH 阳性对照; 3. 阴性对照(去离子水); 4. 海产品菌株(血清型 O3); 5. 海产品菌株(血清型 O3); 6. 海产品菌株(血清型 O5); 7. 海产品菌株(血清型 O4); 8. 海产品菌株(血清型 O4); 9. 暴发型临床菌株(血清型 O3); 10. 暴发型临床菌株(血清型 O3); 11. 暴发型临床菌株(血清型 O4); 12. 散发型临床菌株(血清型 O3); 13. 散发型临床菌株(血清型 O4); 14. 散发型临床菌株(血清型 O5)

图 1 部分副溶血性弧菌的 TDH 基因扩增电泳图谱

3 讨论

3.1 从本实验室以往数据分析,2003 年的 O3 血清群的检出率达到了 87.21 %,O4 血清群为 10.25 %;本次实验结果中 O3 群的检出率只有 71.81 %,O4 群的检出率为 16.60 %,比上年上升了 6 %,并且环境中 O4 群的检出率也达到了 14.86 %,提示我们应加强检测,在预防 O3 群副溶菌暴发的同时,应加强对 O4 群的检测流行。

3.2 本次检测结果显示,临床菌株 TDH 基因检出率为 95.65 %,而海产品菌株 TDH 基因检出率只有 6.06 %。从电泳扩增条带的亮度来看,临床菌株的 TDH 扩增条带亮度很高,而海产品菌株的 TDH 扩增

软冷冻条件对动物性食物营养成分的影响

门建华 杨月欣 石磊 边立华 何梅  
(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

**摘要:**为评价软冷冻条件对动物性食物储存的影响,选择动物性食品为研究样品,观察在软冷冻(-7℃)和传统冷冻(-18℃)条件下,食物的外在表现变化和营养成分的变化。结果表明,在适宜的短期储存条件下,软冷冻可以达到人们对食物储存的保鲜要求,而且保持食物的营养水平。该研究为软冷冻冰箱的开发和研究提供了科学依据。  
**关键词:**冷冻;肉;营养评价;食品保存

**Effect of Soft Freezing Storage on Nutrients of Animal Foods**  
MEN Jian-hua , YANG Yue-xin , SHI Lei , BIAN Li-hua , HE Mei  
(National Institute for Nutrition and Food Safety , Chinese CDC , Beijing 100050 , China)

**Abstract:** It was studied that the effect of soft freezing storage (-7℃) on the nutrients and appearance of animal foods and compared it with that of traditional freezing storage (-18℃). Pork , fish and shrimp were chosen as food samples and were separately deposited under -7℃ and -18℃. The color and texture and nutrients (water , protein , ash , zinc , iron) were observed and determined on the 0 , 7<sup>th</sup> , 14<sup>th</sup> , and 21<sup>th</sup> day. Within a limited time (meat 3 weeks , fish and shrimp 1 week) , soft freezing can keep the animal foods soft and fresh , and retain their nutrients.  
**Key word:** Freezing ; Meat ; Nutrition Assessment ; Food Preservation

-7℃下冷冻,也称软冷冻或称可以不经解冻即可将食物切开的冷冻,此称谓是近年来冰箱行业提出的冷冻新概念。一般在-7℃条件下的冷冻食物可直接用刀切割,无需化冻。软冷冻的概念因对大众生活的“方便化”和“人性化”理念,而被广大消费者所关注,也成为生产厂家竞相开发的产品。目前在短期储存条件下软冷冻对食品营养素的影响报

道较少。本研究选择宏量营养素(蛋白质、水分、灰分)和微量营养素(锌、铁)作为食品在短期储存过程中的营养素观察指标,从食品的营养学角度,探讨软冷冻条件对于动物性食物保存的影响,以及不同动物性食物的适宜储存期,为软冷冻冰箱的开发和应用提供科学依据。

条带很暗。据 Nishibuchi 和 Kaper<sup>[4]</sup> 的报道,大部分临床菌株含 TDH 基因,其拷贝数为 2。从而提示,大多数海产品菌株不含 TDH 基因,含有 TDH 基因的部分海产品菌株可能具有较低的基因拷贝数,需用荧光定量 PCR 做进一步的确定。  
3.3 来源不同但血清群相同的菌株,TDH 基因检出率是不同的。本文检测的 10 株 O4 血清群的临床菌株有 9 株被检出带有 TDH 基因,而 6 株 O4 血清群的海产品菌株只有 1 株被测出带有 TDH 基因。海产品中分离到带有 TDH 基因副溶菌菌株较少,可能与在环境中携带 TDH 基因副溶菌菌株污染较少有关。

**参考文献**  
[1] 金培刚. 浙江省副溶血性弧菌食物中毒分布特点及其传播因素分析[J]. 中国公共卫生学报,1994,13(增刊), 113.  
[2] 何晓青. 卫生防疫细菌检验[M]. 北京:新华出版社, 1989.  
[3] 甄太宏. 细菌学检验手册[M]. 北京:轻工业出版社, 1986.  
[4] Nishibuchi M,J B Kaper. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (TDH) gene in *Vibrio pahaemolyticus*[J]. Mol Microbiol,1990,4:87-99.

[收稿日期:2005-12-17]

中图分类号:R15;R378.3      文献标识码:A      文章编号:1004-8456(2006)02-0112-03

作者简介:门建华 男 主管技师  
通讯作者:杨月欣 女 研究员