

论著

不同来源的副溶血性弧菌定性定量分析及毒素基因检测

马 聪 朱海明 严纪文 宋曼丹 赖蔚苓 何冬梅 王海燕 王 建 杨 冰 邓小玲 柯昌文  
(广东省疾病预防控制中心微生物检验所,广东 广州 510300)

**摘 要:**目的 研究受污染海产品、海产品养殖水及食物中毒临床分离的副溶血性弧菌的生化特性、种特异性基因片段检测方法的应用和毒素基因携带情况。方法 66 株副溶血性弧菌采用全自动微生物鉴定、MPN 值定量、氯化物含量(离子色谱法)、R72H 基因片段和 *tdh*、*trh* 毒素基因 PCR 检测等方法进行研究。结果 定性定量分析方面,98.5%的菌株不发酵阿拉伯糖;牡蛎样本 MPN 值均为  $\geq 24\,000/100\text{ g}$ ,并检出 2 株携带 *trh* 毒素基因;23/30 份养殖水检出副溶血性弧菌,其中海丰监测点 6 份阳性水样的氯化物含量均值仅为  $3\,160\text{ mg/L}$ ,显著低于实验室培养的  $30\text{ g/L}$  的含量。基因检测方面,VITEK 鉴定 R72H 基因片段结果与检测相符;13 株食物中毒临床分离株均携带 *tdh* 毒素基因;6.7%的海产品分离株、15.4%食物中毒临床来源株同时携带两种毒素基因。结论 通过从海产品和养殖水的检出情况以及分离株的生化特性、毒素基因资料,为副溶血性弧菌食物中毒溯源提供重要的数据源。  
**关键词:**弧菌,副溶血性;食源性致病菌;毒性基因检测

Qualitative and Quantitative Analysis and Toxin Genes Detection of  
*Vibrio parahaemolyticus* Isolated from Different Resources

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

**Abstract: Objective** To carry out the *Vibrio parahaemolyticus* isolated from marine products, cultured water and clinical patients by phenotyping qualitative and quantitative analysis combined with toxin genes detection. **Method** By means of VITEK identification, MPN methods, chlorine iron concentration (IC) analysis, R72H gene fragment and *tdh*、*trh* toxin genes detected by PCR. **Results** On the side of qualitative and quantitative results, Datum manifested that 98.5% of *Vibrio parahaemolyticus* isolates didn't ferment arabinose, which differed from guidance of USFDA manual. Two isolates contained *trh* gene had been detected from Oyster that contaminated in high MPN ( $\geq 24\,000/100\text{ g}$ ). Positive rates of cultured water were 23/30, 6/8 samples were positive whose means of concentration of chlorine iron were  $3\,160\text{ mg/L}$ , collected from certain region, were remarkably lower than concentration  $30\text{ g/L}$  that cultured in vitro. On the other side of gene detection results, R72H gene fragment detection results VITEK identification results correspond with. Total 13 of isolations came from clinical resource contained *tdh* gene. Rates of which contained *tdh*、*trh* toxin genes of marine products, cultured water and clinical isolation were 6.7%、0%、15.4%, respectively. **Conclusion** Investigation of above characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from marine products

defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 40(10):3613-3619.

[8] 许一平,成炜,陈福生,等. 多重 PCR 技术在食源性病原细菌检测中的应用[J]. 食品科学,2007,28(2):355-359.

[9] LEE S R, CHUNG J M, KIM Y G. Rapid one step detection of pathogenic bacteria in urine with sexually transmitted disease(STD) and prostatitis patient by multiplex PCR assay (mPCR) [J]. The Journal of Microbiology, 2007,10:453-459.

[10] KONG R Y C, LEE S K Y, LAW T W F, et al. Rapid detected of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR[J]. Water Res, 2002, 36(11):2802-2812.

[收稿日期:2009-05-28]

中图分类号:R155.5;TS207.4 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)05-0398-05

基金项目:广东省“十一五”医学重点专科研究项目(粤卫[2008]50号);广东省自然科学基金团队项目(06201654)。  
作者简介:马 聪 男 检验技师

and cultured water taked a important role of tracing to the source of outbreaks and supplied database establishment with useful information.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; Food-Borne Pathogen; Toxic Genetic Detection

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 主要引起人体急性胃肠炎甚至败血症<sup>[1]</sup>; 国家食源性疾病监测网及国家食品安全信息监测系统统计数据显示: 2002 - 2007 年间暴发的细菌性食物中毒事件中, 副溶血性弧菌位居病原菌之首<sup>[2,4]</sup>。耐热直接溶血毒素 (TDH)、耐热相关溶血毒素 (TRH) 被认为是其重要的致病因素, 分别由 *tdh*、*trh* 基因编码, 能产生溶血性、肠毒素和细胞毒素等致病因子<sup>[1,7-9]</sup>; 相关研究显示, 环境株 *tdh* 和/或 *trh* 毒素基因携带率较低, 而临床分离株携带率可达 90 % 以上<sup>[1,7-10]</sup>; LEE 等<sup>[8]</sup> 和 ROBERT 等<sup>[13]</sup> 研究报道了 R72H 基因片段仅在副溶血性弧菌基因组中特异存在, 可作为其种特异性基因进行鉴定。副溶血性弧菌嗜盐生长, 广泛存在于近海岸的海水、海底沉积物和海产品中, 研究认为受污染的牡蛎中副溶血性弧菌含量高, 经常引起中毒暴发<sup>[2-5]</sup>。本实验收集了不同来源的副溶血性弧菌的基础信息, 通过探讨定性定量方法的应用和毒素基因携带情况, 探究其中毒高发的重要因素, 同时亦建立并验证了中毒溯源的科学监测和检验手段。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 标准株: ATCC 33847 和 ATCC 17802。毒素基因携带情况: ATCC 33847 (*tdh* 基因阳性、*trh* 基因阴性); ATCC 17802 (*tdh* 基因阴性、*trh* 基因阳性)<sup>[11]</sup>。实验株: 30 株分离自监测点的海产品; 23 株分离自各监测点的 30 份海产品养殖水; 13 株为湛江、惠州等地的 4 起副溶血性弧菌食物中毒的临床分离株, 由各地市疾病预防控制中心 (CDC) 分离并上送。实验相关菌株见表 1。

1.2 试剂和仪器 最大可能数法 (most probable number, MPN) 检测培养基采用 3 % 氯化钠碱性蛋白胨水 (APW) 分装, 每管 9 ml; TCBS 平板、生化实验用培养基 (北京陆桥技术有限责任公司); 弧菌显色培养基 (法国科玛嘉公司); 全自动微生物鉴定系统及 NFC 卡片 (法国梅里埃公司 VITEK); Premix Ex Taq<sup>TM</sup> [宝生物工程 (大连) 有限公司]; PCR 扩增仪 (德国 Biometra 公司 TGradient); 离子色谱仪 ICS-2500 (美国戴安公司)。基因检测引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 检测方法

1.3.1 定性定量分析 海产品采用 MPN 法增菌和计数<sup>[12]</sup>, 分离菌株经生化筛选与全自动微生物鉴定

系统确认<sup>[5]</sup>; 海产品养殖水分别用无菌 50 ml 采血管采集, 4 °C 冷藏保存 4 h 内检测, 采用 MPN 法增菌, 分离菌株经生化筛选与全自动微生物鉴定系统确认, 同时作氯化物含量分析; 食物中毒临床分离株经生化筛选与全自动微生物鉴定系统确认。全自动鉴定结果可信值不低于 85 %。

表 1 实验相关菌株

| 菌株编号                                                            | 菌株来源      | 菌株分离年份 |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|--------|
| 05vp161a、174a、279a、280d、282a、283a、289b、290a、292a、295a、297、300a; | 海产品       | 2005   |
| 08vp29E8、E9; 30A1~A6、30C1、C5~C9; 30E4、E5、E8、E9。                 |           | 2008   |
| 04vzjdm33、38、41、42、45、48;                                       | 食物中毒的临床分离 | 2004   |
| 0508Z50073、0508Z50074;                                          |           | 2005   |
| 0604Y50062、66、69; 06vp002 (F) # 2、06vp003 (F) # 3。              |           | 2006   |
| 05vp1 (w) ~13 (w);                                              | 海产品的      | 2005   |
| 06vp1 (w) ~9 (w)。                                               | 养殖水       | 2006   |

养殖水氯化物浓度检测由本中心理化检验所完成分析。

1.3.2 基因检测 菌株均经 R72H 基因片段 PCR 检测及 *tdh* 与 *trh* 基因复合 PCR 检测。模板制备: 菌株转种于 3.5 % 氯化钠 TSA 斜面培养基, 孵育 18 ~24 h。挑取 1 环菌苔 (1 μg) 与 500 μl 灭菌纯水研磨均匀, 悬液 100 °C 水浴 10 min 后冰浴。以 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液作为 DNA 粗制模板。PCR 反应 (50 μl) 体系: 加入 Premix Ex Taq<sup>TM</sup> 25 μl, 模板 DNA 2 μl, 上下游引物各 1 μl (20 μmol/L), 补齐灭菌双蒸水至总体积 50 μl。反应条件设置见表 2, 电泳: PCR 产物用 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 经溴化乙锭染色后于凝胶成像系统中观察。

2 结果

2.1 定性定量分析

2.1.1 生化鉴定 结合实验菌株超过 85 % 可信值和附加生化实验的结果, 确认分离株为副溶血性弧菌; 然而生化结果显示, 98.5 % (65/66) 的海产品、养殖水和食物中毒分离株均不发酵阿拉伯糖, 与参考鉴定的 FDA 标准<sup>[12]</sup> 有分歧。

2.1.2 MPN 值定量 对海产品和养殖水进行 MPN 值统计分析<sup>[5]</sup>。数据显示, 各类海产品中牡蛎样本染菌量显著高于其他样本类别 ( $P < 0.01$ )。养

表 2 副溶血性弧菌基因检测引物序列及 PCR 反应条件<sup>[8,12,13]</sup>

| 目标基因 | 引物名称 | 引物序列(5'-3')                     | 产物(bp)  | 反应条件 <sup>a</sup>                        |
|------|------|---------------------------------|---------|------------------------------------------|
| R72H | Vp33 | tgc gaa ttc gat agg ggg tta acc | 387/320 | 94 ℃1 min(35) ,<br>60 ℃1 min ,72 ℃1 min  |
|      | Vp32 | cga atc ctt gaa cat acg cag c   |         |                                          |
| tdh  | TDH1 | agc ttc cat ctg tcc ctt tt      | 434     | 进行 <i>tdh</i> 和 <i>trh</i> 复合 PCR 检测。    |
|      | TDH2 | att acc act acc act ctc ata     |         |                                          |
| trh  | R2   | ggc tca aaa tgg tta agc g       | 250     | 94 ℃1 min(30) ,<br>55 ℃1 min ,72 ℃1 min。 |
|      | R6   | cat ttc cgc tct cat atg c       |         |                                          |

注:“a”反应设置预变性 94 ℃5 min,再延伸 72 ℃5 min;括号内为循环次数。

殖水总体染菌量较低;个别采样点染菌量较高,如采  
自东莞某餐饮点的 4 份样本 MPN 值均显著高于整  
体 ( $P < 0.01$ ),值得关注(见表 3)。

表 3 海产品及养殖水中副溶血性弧菌 MPN 值主要结果

| 样本来源  | 样本数量 | 副溶血性弧菌数 | MPN 值区间  | 监测点            |
|-------|------|---------|----------|----------------|
| 海产品总计 | 13   | 450     | 30~24000 | 海丰、珠海、湛江       |
| 牡蛎    | 3    | ≥24000  | ≥24000   | 珠海某养殖场、湛江某零售市场 |
| 其他    | 10   | 180     | 30~430   | 海丰、湛江采样点       |
| 养殖水总计 | 23   | 32      | 3~2400   | 海丰、东莞、阳东、始兴、顺德 |
| 东莞采样点 | 4    | ≥2400   | ≥2400    | 某餐饮点养殖池        |
| 其他    | 19   | 9       | 3~24     | 其他地区监测点        |

2.1.3 养殖水检测数据 5 个监测区域 30 份养殖  
水中的 23 份分离出副溶血性弧菌(分别为:海丰 6/  
8、东莞 4/4、阳东 9/9、始兴 2/4、顺德 2/5),染菌量处  
于较低水平(见表 4)。选取检出率较高的海丰监测  
点水样,采用离子色谱法检测其氯化物含量,结果显  
示,氯化物含量均值为 3 160 mg/L,在 1 326 mg/L 的浓  
度下仍检出副溶血性弧菌,显著低于一般认为的生  
长培养所需 30 g/L 的含量<sup>[17]</sup>。

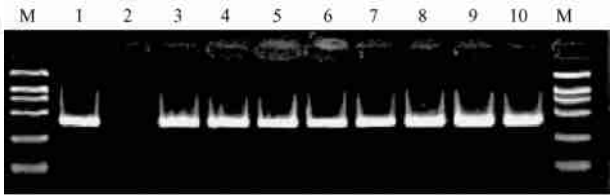
表 4 副溶血性弧菌检出养殖水氯化物含量和染菌量情况

| 来源     | 检出<br>情况 | 检出水样<br>均值<br>(mg/L) | 副溶血性<br>弧菌数<br>(MPN/100 ml) | MPN 值<br>区间<br>MPN/100 g(ml) |
|--------|----------|----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 贝壳类    | 3/5      | 3693                 | 10                          | 3~29                         |
| 海鱼     | 2/2      | 3284                 | 21                          | 19~23                        |
| 海虾     | 1/1      | 6426                 | 19                          | 19                           |
| 检出水样总计 | 6/8      | 3160                 | 17                          | 3~29                         |

2.2 基因检测

2.2.1 R72H 基因片段检测 66 株副溶血性弧菌的  
电泳结果均出现特异的产物条带,未见杂带(见图  
1),阳性结果与 VITEK 鉴定结论一致,显示该基因  
片段作为副溶血性弧菌的种特异性基因效果良好。

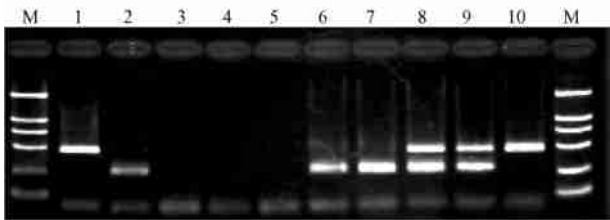
2.2.2 毒素基因检测 66 株副溶血性弧菌进行  
*tdh* 和 *trh* 基因复合 PCR 检测(见图 2 和表 5)数据显  
示:所有 23 株养殖水分离株未见携带 *tdh* 和 *trh* 基  
因;所有 30 株海产品分离株未见携带 *tdh* 基因,而  
其中两株(08vp30E4、E5)携带 *trh* 基因,此两株均分  
离自牡蛎样本(MPN 值 ≥24 000/100 g);海产品与养  
殖水分离株毒素基因总的携带率为 3.8 % (2/53)。



注:Marker 分子量标记分别为 2 000,1 000,750,500,250,  
100 bp。

泳道 1、2 是阳性对照(387 bp)和阴性对照;  
泳道 3、4 为 05vp1(w)、06vp1(w)(养殖水分离株);  
泳道 5、6 为 08vp30E4、E5(海产品分离株);  
泳道 7、8、9、10 为 04vzjdm33、42、06vp002(F) # 2、003(F) #  
3(食物中毒分离株)。

图 1 部分不同来源副溶血性弧菌 R72H 基因片段检测



注:Marker 分子量标记分别为 2 000,1 000,750,500,250,  
100 bp。

泳道 1、2、3 分别是 *tdh*、*trh* 基因阳性对照(434 bp,250 bp)  
和阴性对照;  
泳道 4、5 为 05vp1(w)、06vp1(w)(养殖水分离株);  
泳道 6、7 为 08vp30E4、E5(海产品分离株);  
泳道 8、9、10 为 04vzjdm33、42、06vp002(F) # 2(食物中毒分  
离株)。

图 2 部分不同来源副溶血性弧菌 *tdh*、*trh* 基因检测

食物中毒分离株 *tdh* 携带率为 100 % (13/13), 仅两株 (04vzjdm38、42) 携带 *trh* 基因, 此两株分离自湛江一起食物中毒事件的病人标本; 而其他 3 起暴发均未见携带该基因。

表 5 66 株副溶血性弧菌基因检测结果

| 基因名称                    | 养殖水分离株        | 海产品分离株        | 食物中毒分离株       |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|
| R72H                    | 100 % (23/23) | 100 % (30/30) | 100 % (13/13) |
| <i>tdh</i>              | 0 % (0/23)    | 0 % (0/30)    | 100 % (13/13) |
| <i>trh</i>              | 0 % (0/23)    | 6.7 % (2/30)  | 15.4 % (2/13) |
| <i>tdh</i> + <i>trh</i> | 0 % (0/23)    | 0 % (0/30)    | 15.4 % (2/13) |

3 结论

国内外研究普遍采用 MPN 法作为副溶血性弧菌污染海产品特别是牡蛎的定量检测方法<sup>[5,7,8,12]</sup>。本研究结果显示, 牡蛎中副溶血性弧菌的 MPN 值显著高于其他海产品。鉴于我省普遍生食牡蛎的习惯, 高染菌量和携带毒素基因可考虑为中毒频发的重要因素<sup>[4,5]</sup>。此外, 养殖水定量分析显示, 某些餐饮点的高染菌量有引发食物中毒暴发的潜在危险, 而副溶血性弧菌对养殖水的广泛污染可能会持续地传播到海产品中, 导致食物中毒事件难于真正溯源。

实验数据显示, 98.5 % 实验株阿拉伯糖发酵试验阴性。ROBERT M 等<sup>[15]</sup> 研究指出分离自日本和美国的副溶血性弧菌其生化特性 (包括阿拉伯糖发酵) 存在差异<sup>[13,15]</sup>; 国内也有阿拉伯糖阴性株的报道<sup>[13]</sup>。因此, 本实验在生化筛选中参考了 2003 版国标法对阿拉伯糖发酵“可变”的结果, 没有采用 USFDA 的参考方法“+”<sup>[10]</sup> 的结果作为判定依据。

养殖水氯化物含量的检测结果似乎显示, 副溶血性弧菌在低盐的环境下尚能低浓度地存活, 结论尚待进一步研究证实。养殖水由于其流动性会持续污染其他海产品甚至淡水产品<sup>[4,5]</sup>, 引起各地频繁的食物中毒的情况是可以预期的。

种特异性基因检测配合 VITEK 结论能较好地鉴定副溶血性弧菌, 毒素基因携带率与国内外相关研究相近<sup>[1,7-10]</sup>。实验结果值得注意的是, 牡蛎样本 MPN 值高以及检出携带 *trh* 基因, 再次强调了其监测的重要性。食物中毒株 *tdh* 基因携带率较高, 但仅在 1 起中毒事件中检出 *trh* 基因, 推测与 HIROMASA 等<sup>[10]</sup> 研究指出的不同血清型食物中毒分离株 *trh* 基因携带率存在差异有关。由此可见, 进一步研究可结合血清分型及分子流行病学方法, 从而更好地完善副溶血性弧菌检测和溯源方法。

(志谢: 感谢中国疾病预防控制中心营养与食品安全所的技术指导; 感谢我中心微生物检验所王洪敏博士, 理化检验所钟志雄、姚敬同志参与实验以及各地市 CDC 给予的研

究支持。)

参考文献

[1] 朱雪兰, 陈艳. 副溶血性弧菌溶血素基因及其检测的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2007, 34(4): 233-237.

[2] 刘秀梅, 陈艳, 樊永祥. 2003 年中国食源性疾病暴发的监测资料分析[J]. 卫生研究, 2006, 25(2): 201-204.

[3] 程苏云, 张俊彦, 王赞信, 等. 海水产品副溶血性弧菌污染定量检测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 336-338.

[4] 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, 18(2): 112-113.

[5] 陈艳, 刘秀梅, 王明, 等. 温暖月份零售带壳牡蛎中副溶血性弧菌的定量研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(3): 207-209.

[6] 程苏云, 李恩民, 张俊彦, 等. 不同来源的副溶血性弧菌生物学特性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(2): 112-113.

[7] JUN O, ISHIBASHI M, ABBOTT S L, et al. Analysis of the thermostable direct hemolysin (*tdh*) gene and the *trh*-related hemolysin (*trh*) genes in urease-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated on the west coast of the United States [J]. J. Clinical Microbiology, 1997, 35(8): 1965-1971.

[8] LEE C Y, PAN S F, CHEN C H. Sequence of a cloned pR72H fragment and its use for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish with the PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1311-1317.

[9] NISHIBUCHI M, FASANO A, ROBERT G R, et al. Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin [J]. Infection and Immunity, 1992, 60(9): 3539-3545.

[10] SHIRAI H, ITO H, HIRAYAMA T, et al. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis [J]. Infection and Immunity, 1990, 58(11): 3568-3573.

[11] 李晓虹, 闫东丽. 利用多重 PCR 检测食品中副溶血性弧菌的方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 11(17): 1975-1977.

[12] USFDA, CFSA. Chapter 9, vibrio, Bacteriological Analytical Manual Online [EB/OL]. [2004-5]. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bar-9.html>.

[13] 姚健, 邵荣标. 副溶血性弧菌 185 株的生物学特性探讨[J]. 南通医学院学报, 2003, 23(1): 40-42.

[14] ROBERT PA, GUENOLE A F. Usefulness of R72H PCR assay for differentiation between *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* species validation by DNA-DNA hybridization [J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 215(1): 1-6.

[15] ROBERT M T, PROCTER L S, HERBERT E H. Cultural, biochemical, and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States [J]. J Bacteriology, 1969, 98(2): 511-518.

[16] ZIMMERMAN A M, DEPAOLA A, BOWERS J C, et al. Variability of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* densities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(23): 7589 - 7596.

[17] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.7—2008 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

[收稿日期: 2009 - 03 - 01]

中图分类号: R378.3; TS207.4 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 8456(2009)05 - 0402 - 04