

文章编号: 1673-1689(2011)05-0711-05

东部沿海贝类中副溶血弧菌的分布及特征

赵峰^{1, 2}, 周德庆^{* 1}, 于维森³, 王伟栋³, 李毅财^{1, 2}, 刘帅帅¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266017; 2. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 3. 青岛市疾病预防控制中心, 山东 青岛 266033)

摘要: 为调查我国东部沿海城市零售贝类中副溶血弧菌的分布情况及其血清型和分子特征。共采集了 288 个贝类样品, 采用 MPN-PCR 方法进行定量研究, 分离得到的菌株用 RAPD 方法进行分子分型并考察其毒力基因携带情况。结果显示, 贝类中副溶血弧菌含量季节分布明显, 夏季显著高于其他季节($P < 0.05$); 共分离得到 172 株副溶血弧菌, 其中 157 株可区分其 O 群, 42 株可区分其 K 型, O3 群菌株最多, 占 19.1%; RAPD 结果显示, 172 株菌共有 73 种带型, 可分成 18 个类群; 共检测到 2 株菌含 *tdh* 基因, 5 株菌含 *trh* 基因, 未检测到同时含上述两种基因的菌株; 2 株含 *tdh* 基因菌株的血清型分别为 O3:K6 和 O4:K68, RAPD 结果显示它们属于同一个类群。

关键词: 副溶血弧菌; 血清型; 毒力基因; RAPD 分型

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Distribution and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* in Shellfish from Eastern Coast of China

ZHAO Feng^{1, 2}, ZHOU De-qing^{* 1}, YU Wei-sen³, WANG Wei-dong³,
LI Yi-cai^{1, 2}, LIU Shuai-shuai¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Qingdao Municipal Center for Disease Control and Prevention, Qingdao 266033, China)

Abstract: To investigate the distribution, serological and molecular characterization of *vibrio parahaemolyticus* of shellfish, a total of 288 samples were collected and analyzed in this manuscript. The levels of *V. parahaemolyticus* were estimated by MPN-PCR and isolated strains were clustered by RAPD analysis. The *tdh* and *trh* genes were detected by PCR. The results showed that the distribution of *V. parahaemolyticus* was disparity in season, the level of *V. parahaemolyticus* in summer were different from other seasons ($P < 0.05$). Altogether 172 strains were isolated and identified, of which 157 strains were typed by O-grouping serum and 42 strains were typed by K-typing serum, the group of O3 (19.1%) was the most frequently involved in shellfish. RAPD analysis showed that there were 73 different patterns which were

收稿日期: 2010-10-21

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA09Z438); 青岛市科技计划项目(09-1-3-21-jch)。

作者简介: 赵峰(1982-), 男, 山东烟台人, 水产品加工及贮藏工程博士研究生。Email: zhaof_cn@163.com

* 通信作者: 周德庆(1962-), 男, 山东招远人, 农学博士, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事水产品加工与质量安全方面的研究。Email: zhoudq@ysfri.ac.cn

clustered into 18 groups. Two isolates showed positive of *tdh* gene and 5 isolates showed positive of *trh* gene, there was no strain with *tdh* and *trh* genes simultaneously. The serovars of two isolates with *tdh* gene were O3: K6 and O4: K68 and two isolates were grouped into the same cluster by RAPD analysis.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype, virulence genes, RAPD typing

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于弧菌科,弧菌属,革兰氏阴性嗜盐杆菌,主要分布于海水及海产品中,最早于1950年在日本一次暴发性食物中毒中被分离发现^[1],是我国大陆沿海地区食物中毒中最常见的致病菌。人们通常是由于食用了生的或者加热不彻底的海产品及交叉污染而感染副溶血弧菌并引起食物中毒的,中毒症状多为头疼、腹泻、呕吐反胃、胃部痉挛和发低烧,少数情况下可引起败血症,进而导致死亡^[2]。

副溶血弧菌的致病机理已有大量研究,目前,普遍认为耐热直接溶血素——TDH (thermostable direct hemolysin) 和 TDH 相关溶血素——TRH (thermostable direct hemolysin-related hemolysin) 是主要的致病因子,副溶血弧菌中存在其中一种和两种上述溶血素都可能引起人类患病,TDH 和 TRH 分别由 *tdh* 和 *trh* 基因编码^[3]。此外,其它一些副溶血弧菌的表达调控基因如 *tlh*、*gyrB* 和 *toxR* 也相继被发现,这3种基因在副溶血弧菌中广泛存在,因而常作为副溶血弧菌检测的靶基因。

副溶血弧菌在海水及海底沉积物中都有存在, Luigi Vezzulli 等^[4]人对海洋环境中的副溶血弧菌进行了检测。结果显示:当温度高于 25℃时,海水中的副溶血弧菌的含量高于沉积物中的;当海水温度低于 14℃时,沉积物中的则高于海水中的。贝类由于其底栖的生活方式和滤食性特点,体内可富集大量副溶血弧菌。我国是贝类生产大国,2008年产量达 1072 万 t。东部沿海省份(山东、江苏、浙江、福建)的产量占全国总产量的 60% 左右^[5]。而且贝类味道鲜美,沿海地区居民多喜食。因此,考察东部沿海城市贝类中副溶血弧菌的分布及其特征,对我国贝类的消费和出口都具有重要的指导作用。

1 材料与方法

1.1 菌株及样品

标准菌株 3 株,分别为副溶血弧菌 1.1997、副溶血弧菌 1.1615 和副溶血弧菌 1.1616,均购于中国科学院普通菌种保藏中心。

采集了我国东部烟台、威海、青岛、连云港、舟山和厦门共 6 个沿海城市零售的 4 种贝类——牡蛎、菲律宾蛤仔、紫贻贝和栉孔扇贝。从 2008 年 12 月至 2009 年 11 月,每月采集一次,共 288 个样品。样品采集以购买大型农贸市场零售贝类为主,购买后加冰保存,并于 24 h 内运至实验室处理。

1.2 贝类中副溶血弧菌的分离及定量

贝类中副溶血弧菌的分离,参照 GB4789.7—2008 食品微生物检验副溶血性弧菌检验所述的方法进行^[6]。TCBS 培养基上分离的可以菌落,用 PCR 方法确定是否为副溶血弧菌。定量采用 MPN-PCR 方法^[4],然后对照 MPN 表,得出每个样品中副溶血弧菌的含量。

1.3 DNA 提取

取上述可疑菌落培养液 1 mL,采用 Ausubel 等^[7]报道的方法提取 DNA。提取到的 DNA 溶解在超纯水中。用分光光度计测其浓度,并定量至约 50 mg/μL, -20℃冰箱中保存备用。

1.4 PCR 检测

通过检测 *tlh* 基因来判断可疑菌落是否为副溶血弧菌,然后检测是否含有毒力基因 *tdh* 和 *trh*,所使用的引物如文献[8]报导。PCR 采用 20 μL 反应体系,其中包括 1 μL DNA 模板,2 μL 10× PCR buffer,双向引物(10×10^{-9} mol/μL)各 1 μL,1 μL dNTPs (2.5 mmol/L),1 U Taq 酶加超纯水补足至 20 μL。反应体系如下:94℃预变性 5 min,进入循环,94℃变性 30 s,58℃退火 40 s,72℃延伸 50 s,共 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。反应结束后,用 1 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.5 血清分型

血清分型使用日本生研的副溶血弧菌血清试剂盒进行。实验前,菌株在含 3 g/dL NaCl 的大豆蛋白琼脂上培养 18~24 h,取适量菌体参照说明书进行鉴定。

1.6 RAPD 分型

RAPD 反应采用 25 μL 反应体系,其中包括 2 μL DNA 模板,2 μL 10× PCR buffer,引物(10×10^{-9} mol/μL)各 2 μL,3 μL dNTPs (2.5 mmol/L)

L), 1.5 U Taq 酶加超纯水补足至 25 μ L。反应体系如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 进入循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 36 $^{\circ}$ C 退火 90 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 150 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后, 用 1.5 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳进行检测^[9]。

1.7 数据处理

采用 SPSS16.0 软件对副溶血弧菌的含量进行分析, 采用其中的单因素方差分析方法对不同季节、不同贝类和不同地域样品中的副溶血弧菌含量进行比较。

RAPD 结果按照条带的有无分别用“1”和“0”来表示并进行统计。统计结果使用 NTsys 软件, 采用 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 统计方法进行聚类分析, 并构建进化树。

2 结果与分析

2.1 贝类中副溶血弧菌的季节分布

为了便于研究贝类中副溶血弧菌的季节分布。将样品按春季 (3~5 月)、夏季 (6~8 月)、秋季 (9~11 月) 和冬季 (12~2 月) 进行了分类。结果显示: 夏季贝类中副溶血弧菌的含量最高, 平均值达 9.0×10^2 MPN/g, 秋季和春季次之, 冬季最低, 见图 1。不同季节样品的检出率与含量具有相同的规律, 分别为: 52.8% (春)、80.5% (夏)、63.9% (秋) 和 41.6% (冬)。表明贝类中副溶血弧菌的含量和检出率在夏季达到了峰值。取副溶血弧菌含量的 lg₁₀ 值, 经单因素方差分析, 显示不同季节的副溶血弧菌含量存在显著差异 ($P < 0.05$)。经 S-N-K 方法

进一步分析显示: 夏季和冬季的副溶血弧菌含量同其它季节存在显著差异, 而春秋两季之间差异不显著。

2.2 不同贝类中副溶血弧菌的分布

按照贝类品种将采集的样品进行分类。分析结果显示: 牡蛎中副溶血弧菌的检出率最低为 48.8%, 其次为扇贝 (60.0%)、蛤蜊 (63.9%), 最高的为贻贝 (68.1%)。上述 4 种贝类中副溶血弧菌的平均含量分别为 3.0×10^2 、 4.0×10^2 、 4.2×10^2 、 3.9×10^2 MPN/g。取副溶血弧菌含量的 lg 值, 经单因素方差分析, 显示不同贝类的副溶血弧菌含量不存在显著差异 ($P = 0.291 > 0.05$)。

2.3 贝类中副溶血弧菌的地域分布

将样品按采样城市进行分类。不同城市贝类中副溶血弧菌的检出率和平均浓度分别为: 连云港 (66.0%, 4.9×10^2 MPN/g)、青岛 (61.1%, 3.1×10^2 MPN/g)、威海 (57.8%, 3.0×10^2 MPN/g)、厦门 (54.7%, 3.8×10^2 MPN/g)、烟台 (53.1%, 91 MPN/g)、舟山 (63.8%, 5.2×10^2 MPN/g)。从中可以看出: 检出率最高的为连云港, 平均浓度最高的为舟山; 检出率和平均浓度最低的均为烟台。取副溶血弧菌含量的 lg 值, 经单因素方差分析, 显示不同地域的副溶血弧菌含量存在显著差异 ($P = 0.015 < 0.05$)。进一步将烟台同其它城市进行比较, 经 LSD 方法分析显示: 烟台和威海贝类中副溶血弧菌的含量不存在显著差异 ($P = 0.85 > 0.05$), 但同其它城市存在显著差异, 结果见表 1。贝类中副溶血弧菌的含量存在地域差异, 地域上临近的城市其含量分布相近。

2.4 副溶血弧菌的血清型

288 个样品中, 共检出副溶血弧菌 172 株。其中 155 株分属于 9 个不同的 O 群, 17 株无法区分其 O 群。9 个 O 群中以 O3 群的菌株数最多, 共有 33 株, 占分离菌株总数的 19.2%。K 型分析结果显示, 仅有 42 株可区分其 K 型, 存在大量不可分型的菌株, 具体分型结果见表 2。

2.5 副溶血弧菌的 RAPD 分型结果

电泳结果显示, 172 株副溶血弧菌共有 73 中不同的带型。经聚类分析, 结果显示: 在相似系数为 0.85 时, 172 株副溶血弧菌分别归属于 18 个 RAPD 类群。按地域对 RAPD 类群分析显示, 类群 A~E 的副溶血弧菌在 4 个省份中都有分布, 占分离株总数的 59.8%, 应为副溶血弧菌的优势类群, 结果见表 3。

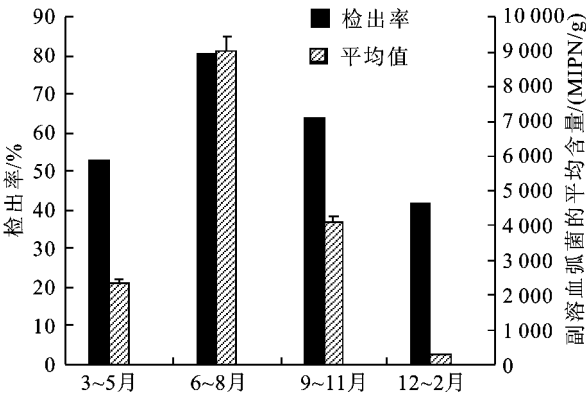


图 1 不同季节贝类中副溶血弧菌的平均含量及检出率

Fig.1 Detectable rate and Mean value of *V. parahaemolyticus* in different seasons

表 1 烟台同其它城市的 LSD 分析结果

Tab.1 Results of LSD analysis between Yantai and other cities

(I)城市	(J)城市	平均差 (I- J)	标准误	显著性	95% 置信区间	
					下限	上限
烟台	连云港	- 7.08662003753 2434E- 1*	0.22718909 6261409	0.002	- 1.1556564413 2951E0	- 2.6166756617 6975E- 1
	青岛	- 4.11074578935 8163E- 1*	0.20399632 6933075	0.045	- 8.1243725401 8404E- 1	- 9.7119038532 2884E- 3
	威海	- 4.03836428025 6572E- 1	0.23355416 8035321	0.085	- 8.6335414125 4375E- 1	5.56812852030 606E- 2
	厦门	- 5.39344406015 5534E- 1*	0.23646590 8568407	0.023	- 1.0045909673 4206E0	- 7.4097844689 0507E- 2
	舟山	- 7.31550184858 4418E- 1*	0.21819780 5391870	0.001	- 1.1608542619 7529E0	- 3.0224610774 1592E- 1

表 2 172 株副溶血弧菌的血清型及 RAPD 分型结果

Tab.2 Serotype and RAPD clusters of 172 *V. parahaemolyticus* from shellfish samples

O 群 菌株数		K 型(菌株数)	RAPD 类群
O1	24	K25 (1), K32 (4), K38 (1), KUT (18)	A (3), B (4), C (1), D (2), E (4), F (1), G (1), H (1), I (1), J (2), M (1), MS (3)
O2	14	K3 (1), K28 (3), KUT (10)	A (3), B (1), C (2), E (1), G (1), I (4), K (1), P (1)
O3	33	K6 (1), K17 (1), K29 (2), K33 (7), K57(1), KUT (21)	A (6), B (3), C (3), D (7), F (2), H (1), I (1), K (2), L (1), M (2), MS (1), N (1), O (1), Q (2)
O4	26	K34 (3), K4 (3), K42(2), K53 (1), K63 (1), K68 (1), K8(1), KUT (14)	A (7), B (5), C (2), D (1), E (2), F (2), H (1), J (2), L (2), N (1), R (1)
O5	10	K15 (1), K17 (2), KUT (7)	A (2), B (2), C (2), D (2), L (1), MS (1)
O6	1	KUT (1)	O (1)
O8	3	K41 (1), KUT (2)	C (1), F (1), G (1)
O10	26	K24 (2), KUT (24)	A (5), B (1), C (5), D (3), E (4), F (1), G (1), H (3), M (1), O (1), R (1)
O11	18	K40 (1), K51 (1), KUT (16)	A (3), B (4), C (2), D(1), E (1), G (2), H (1), I (1), K (1), N (1), I (1)
UTa	17		A (2), B (3), C (1), D (1), E (1), F (1), G (1), J (2), K (1), L (1), M (1), MS (1), P (1)

表 3 不同省份副溶血弧菌 RAPD 及毒力基因检测结果

Tab.3 Characteristics of *V. parahaemolyticus* isolated from different provinces

省份	RAPD 类群	tdh 阳性			trh 阳性		
		数量	血清型	RAPD 类群	数量	血清型	RAPD 类群
山东	A, B, C, D, E, F, G, I, J, K, N, O, P, Q, MS1, MS5, MS6	1	O3:K6	N	2	O2:KUT O10:KUT	K C
江苏	A, B, C, D, E, F, H, I, J, M, P, MS2, MS4	0			1	O4:K42	C
浙江	A, B, C, D, E, H, K, N, M, P, MS3	1	O4:K68	N	1	UT	B
福建	A, B, C, D, E, H, J, K, L, M, P	0			1	O10:KUT	C

2.6 副溶血弧菌的毒力基因检测

在 172 株副溶血弧菌中, 共检测出 *tdh* 阳性株 2 个, 占 1.2%; *trh* 阳性株 5 个, 占 2.9%。2 株 *tdh* 阳性株的血清型分别为 O3: K6 和 O4: K68。文献报道上述两种血清型均在临床分离菌株中存在, 表明两株 *tdh* 阳性株可能为致病性副溶血弧菌。RAPD 分型结果显示, 两株 *tdh* 阳性株属于同一个 RAPD 类群, 显示两株菌亲缘关系较近。

3 结 语

副溶血弧菌是一种主要的食源性疾病的致病菌, 在海产品多有分布。作者在所有的贝类品种中都检出了副溶血弧菌, 表明副溶血弧菌在贝类中广泛分布。副溶血弧菌的分布具有明显的季节和地域差异, 表明其分布受环境因素影响较大。Parveen 等^[10]研究了温度、盐分、pH 值、溶氧量以及粪大肠菌群数量等海水环境因素对副溶血弧菌含量的影响。结果显示, 温度对副溶血弧菌的影响最大, 相关性达 68%。其次为大肠菌群数量, 相关性为 8.4%, 而粪大肠菌群数量是海水质量的一个表征指标, 说明海水质量对副溶血弧菌的分布也有一定的影响。贝类中副溶血弧菌的季节分布明显, 应是不同季节的温度变化造成的。Luigi Vezzulli 等^[4]研究表明, 当海水温度高于 25℃, 海水中副溶血弧菌的含量明显升高, 因此, 在气温较高的季节应加

强副溶血弧菌的监控。近年来, 沿海城市受人口增多和工业发展等因素的影响, 环境污染加剧, 本研究一些城市的副溶血弧菌含量较高, 同环境污染存在一定的关系。

副溶血弧菌的血清分型分辨力低, 存在大量不可区分的菌株。本研究中有 17 株副溶血弧菌无法区分其 O 群, 130 株无法鉴定出其 K 型, 表明血清分型具有一定的局限性。此外, 血清分型成本较高, 血清试剂主要由日本公司垄断, 国内相关试剂较少。RAPD 技术能很好的克服上述缺点, 作者利用 RAPD 将 172 株菌进行了分型, 不存在无法区分的菌落, 而且 RAPD 操作简单, 不需要昂贵的仪器设备, 便于应用。RAPD 是在基因水平上对副溶血弧菌进行分型, 其结果能反应副溶血弧菌的亲缘关系及进化特征, 在食品溯源系统以及流行病学调查方面都有应用价值。

Wong 等^[11]利用 PFGE 对临床分离的副溶血弧菌进行了分型, 结果显示: 血清型 O3: K6、O4: K68、O1: K25 和 O1: KUT 可归类于同一类群中, 推断它们可能有相同的祖先, 通过基因的水平转移而形成不同的血清型。作者分离得到了两株 *tdh* 阳性株, 其血清型分别为 O3: K6 和 O4: K68, 经 RAPD 分析显示, 两株菌归属于同一 RAPD 类群, 同文献报道的结果相似。表明 O3: K6 及其相关血清型仍是副溶血弧菌的主要致病类型。

参考文献 (References):

- [1] Daniels N A, Ray B, Easton A, et al. Emergence of a new O3: K6 *V. parahaemolyticus* serotype in raw oysters[J]. **JAMA**, 2000, 284: 1541–1545.
- [2] Honda T, Iida T, Akeda Y, et al. Sixty Years of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. **Research Microbe**, 2008, 3: 462–466.
- [3] 王娜, 陶妍. 水产品三种致病菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(3): 397–402.
WANG Na, TAO Yan. Establishment of a multiplex PCR for detection of three types of pathogen in aquatic foods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3): 397–402. (in Chinese)
- [4] Luigi V, Elisabetta P, Mariapaola M, et al. Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (*La Spezia* Gulf, Italy) [J]. **Environmental Microbiology**, 2009, 58: 808–818.
- [5] 中华人民共和国农业部渔业局. 2008 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [6] GB/T 4789.7-2008. 食品微生物检验-副溶血性弧菌检测[S].
- [7] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Current protocols in molecular biology[M]. New York: Wiley, 1987.
- [8] Bej A K, Patterson D P, Brasher C W, et al. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh*, and *trh*[J]. **Journal of Microbiological Methods**, 1999, 36: 215–225.
- [9] Mahmud Z H, Kassu A, Mohammad A, et al. Isolation and molecular characterization of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* from the Kii Channel, Japan [J]. **Microbiological Research**, 2006, 161: 25–37.
- [10] Parveen S, Hettiarachchi K A, Bowers J C, et al. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay oysters and waters [J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2008, 128: 354–361.
- [11] WONG H C, CHEN S Y, CHEN M Y, et al. Pulse-field gel electrophoresis analysis of *Vibrio vulnificus* strains isolated from Taiwan and the United States[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004, 70(9): 5153–5158.