

文章编号: 1673-1689(2011)02-0278-05

# 上海市水产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及毒力基因和血清型分布

高 玮, 潘迎捷, 赵 勇, 卢 瑛, 孙晓红\*

(上海海洋大学 食品学院, 上海 201306)

**摘 要:** 为了了解上海市市售水产品中副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*) 污染状况和血清型, 为防治 *Vp* 引起的食源性疾病提供依据。采用 GB/T 4789.7-2008 国标方法进行分离和生理生化鉴定, 根据 FDA 推荐的引物对种特异性 *tlh* 基因和毒力基因(*tdh*, *trh*) 进行 PCR 检测。从 161 份水产品中分离鉴定得到 45 株副溶血性弧菌, 平均检出率为 27.95%。通过 PCR 检测分离株的 *tdh* 和 *trh* 毒力基因发现, 45 株副溶血性弧菌均为 *trh* 阴性, 7 株为 *tdh* 阳性。45 株副溶血性弧菌经血清凝集, 结果共分出 7 个血清群, 分别为 O1 群占 2.2% (1/45), O3 群占 24.4% (11/45)、O4 群占 15.6% (7/45)、O5 群占 20.0% (9/45)、O9 群占 4.4% (2/45)、O10 群占 8.9% (4/45)、O11 群占 26.7% (12/45)。

**关键词:** 水产品; 副溶血性弧菌; 分离; 鉴定; 毒力基因; 血清型

中图分类号: Q 938.2

文献标识码: A

## Isolation, Identification, Serotype and Virulence of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated from the Aquatic Products in Shanghai Markets

GAO Wei, PAN Ying-jie, ZHAO Yong, LU Ying, SUN Xiao-hong\*

(College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*) has been considered as one of the most threatening foodborne bacterial pathogens. The aim of this study is to uncover the situation of contamination of *Vibrio parahaemolyticus* which isolated from the shellfish in the retail market of Shanghai, and provide some guidelines for *Vp* prevention. For this, we carried out the international method GB/T 4789.7-2008 to isolate bacteria and analyze its physiological and biochemical characteristics. Additionally, some primers for *tlh* specific genes and virulence genes (*tdh*, *trh*) recommended by FDA were used for the PCR analyze. The result shows that 45 strains of *Vibrio parahaemolyticus* were isolated from 161 samples which come from the shellfish market of Shanghai. The average detection rate is 27.95%. Based on the PCR detection of *tdh* and *trh* gene, there were only 7 *tdh* gene found among the 45 strains, but none of them contain the *trh* gene. 45 strains of *Vp* consisted of 7 serum groups: O1 2.2% (1/45), O3 24.4% (11/45), O4 15.6% (7/45), O5 20.0% (9/45), O9 4.4% (2/45), O10 8.9% (4/45), O11 26.7% (12/45).

收稿日期: 2010-04-26

基金项目: 霍英东教育基金会第十一届高等院校优选资助项目(114035); 上海市教育委员会重点学科建设项目项目(J50704)。

\* 通信作者: 孙晓红(1978-), 女, 江苏射阳人, 理学博士, 讲师, 主要从事食源性致病菌流行病学方面的研究。

Email: xhsun@shou.edu.cn

45), 05 20 0%(9/45), 09 4. 4% (2/45), 010 8 9%(4/45), 011 26. 7% (12/45).

**Key words:** aquatic products, *Vibrio parahaemolyticus*, isolation, identification, detection, serotypes

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*)是一种革兰氏阴性兼性厌氧菌,广泛分布于海岸线区域、盐湖及海产品中,温热地带较多。该菌能感染鱼类、虾类、贝类等多种水产品,是海洋水体及海洋生物的主要致病菌之一<sup>[1]</sup>,可导致文蛤、斑节虾、对虾等甲壳类水产动物致病<sup>[2]</sup>。副溶血弧菌不仅是多种水生动物的致病菌,同时也是引起人急性食物中毒的常见病原菌。感染此菌后多表现为腹泻、恶心、呕吐等症状,重症患者可出现脱水、休克等现象。目前已有报告指出其在全球的发病率显著增加,2000~2007年,上海市由*Vp*致集体性食物中毒事件起数与涉及患者人数分别占同期食物中毒事件起数与患者人数的57.4%和56.0%<sup>[3]</sup>。

致病性的副溶血性弧菌中含有耐热性溶血毒素(thermostable direct hemolysin, TDH)或TDH相关溶血毒素(TDH related hemolysin, TRH)或两者都有。分别编码TDH和TRH的*tdh*和*trh*基因是副溶血性弧菌的主要毒力基因。近年来,在食物中毒事件中分离得到的副溶血性弧菌以O3:K6血清型为主,且无明显的地域差别<sup>[5-6]</sup>。作者在食物中毒高发季节(5~10月)对上海市售的水产品进行*Vp*检测,了解水产品中*Vp*的污染情况,利用生化鉴定法、PCR测定法进行鉴定,并研究其所含毒力基因类型分布及O型血清的类型,为研究副溶血性弧菌在水产品中的流行状况与毒力基因的分布提供参考,为副溶血性弧菌的风险评估研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品来源

从上海市铜川路水产市场采集鱼、虾、贝、蟹、头足5类20种共161份样品,采样时间为2009年5~10月,样品保存于保鲜袋中,在运往微生物实验室后被立即处理。副溶血性弧菌标准菌株ATCC33846、ATCC17802,均购自中国科学院微生物研究所。

### 1.2 培养基及试剂

硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂、营养肉汤:购自上海市疾病预防控制中心;蛋白胨:购自北京陆桥公司;科玛嘉培养基:购于上海科

玛嘉微生物技术有限公司;PCR所用试剂和UNIQ-10柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒:均购自上海生工生物工程技术有限公司;D2000 DNA Ladder Marker:购自贝博公司;副溶血性弧菌诊断血清来源:11种O群分群血清:由日本生研所生产,有效期内使用。

### 1.3 副溶血性弧菌的初步分离

试验样品的处理*Vp*分离方法为传统的分离方法,参照GB/T4789.7-2008,每份样品做3份平行。

### 1.4 分离菌株的鉴定

参照GB/T4789.7-2008,对*Vp*进行氧化酶试验、形态学鉴定、嗜盐性试验和生理生化鉴定。参照FDA 2004 Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 9,对疑似*Vp*菌株用PCR技术扩增*Vp*种特异性的*tdh*基因。*Vp*基因组DNA的提取按照UNIQ-10柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒说明书进行。

### 1.5 菌株毒力基因的分布检测

参照FDA 2004 Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 9中PCR检测方法,对鉴定过的*Vp*菌株进行毒力基因*tdh*和*trh*的扩增,来分析毒力基因在副溶血性弧菌中的分布情况。引物及反应条件见表1,2。

表1 引物名称及序列

Tab.1 Names and sequences of primers

基因	引物	序列	扩增长度/bp
<i>tdh</i>	<i>tdh</i> L	5'aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3'	450
	<i>tdh</i> R	5'get act ttc tag cat ttt etc tgc 3'	
<i>trh</i>	<i>trh</i> L	5'gta aag gtc tet gac ttt tgg ac 3'	270
	<i>trh</i> R	5'tgg aat aga acc ttc atc ttc acc 3'	
<i>tdh</i>	<i>tdh</i> L	5'ttg gct tgc ata ttt tea gta tet 3'	500
	<i>tdh</i> R	5'cat aac aaa cat atg ecc att tcc g 3'	

表2 扩增条件

Tab.2 Conditions for amplification profiles

基因	变性	退火	延伸	循环次数
<i>tdh</i>	94°C 4 min	60°C 1 min	72°C 5 min	25
<i>trh</i>	94°C 11min	60°C 1 min	72°C 11min	25
<i>tdh</i>	94°C 4 min	60°C 1 min	72°C 5 min	25

## 1.6 副溶血性弧菌血清分群

严格按说明书操作步骤进行。取一定量细菌于5%甘油和生理盐水混合液中,经121℃高压灭菌1h,离心,弃去上清液,然后用生理盐水洗涤,离心10min(3000r/min),弃上清液,沉淀于500μL的生理盐水中重悬。然后先在载玻片上不同区域各加1滴抗血清和生理盐水,分别滴入10μL的样品悬液,观察是否有白色絮状沉淀。

## 1.7 统计方法

数据统计分析采用SPSS 11.5软件,比较样品中副溶血性弧菌阳性率的差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 传统分离方法结果

在TCBS琼脂上得到50株蓝色或蓝绿色菌落,转接至科玛嘉培养基上得到紫红色菌落45个。其余为白色,可能为创伤弧菌或哈维氏弧菌<sup>[6]</sup>。这表明传统分离方法中使用TCBS培养基不能密集划线,否则可能会掩盖其他种的菌落。之后对在显色培养基科玛嘉培养基上所分离的45株进行生化鉴定,结果为副溶血性弧菌,见表3。其余5株为头足类样品中分离出的哈维氏弧菌。

表3 45株分离菌株生化特征

Tab. 3 45 isolated strains in biochemistry tests

生化项目	结果
氧化酶	+
3 g/dL NaCl 三糖铁斜面	变红
3 g/dL NaCl 三糖铁底层	变黄、不产气
硫化氢	-
无盐胰胨水	澄清
3 g/dL NaCl 胰胨水	浑浊
7 g/dL NaCl 胰胨水	浑浊
10 g/dL NaCl 胰胨水	澄清
靛基质	+
V-P	-
动力	+
赖氨酸脱羧酶	+
精氨酸双水解酶	-

+ 出现; - 未出现

### 2.2 副溶血性弧菌 *tlh* 基因的检测

对传统方法分离出的45株菌株进行 *tlh* 基因的PCR扩增,同时以ATCC33846菌株和灭菌的双

蒸水作阳性及阴性对照。全部菌株均在450bp处扩增出单一的特异性条带,与目标条带一致。此结果表明,分离菌株为副溶血性弧菌,进一步验证了传统方法的鉴定结果。

### 2.3 毒力基因 *tdh* 和 *trh* 的分布检测

对鉴定过的45株副溶血性弧菌进行 *tdh* 和 *trh* 基因扩增。电泳图谱中显示,在263bp处出现单一的特异性条带与阳性对照条带一致,因此可以判定含有 *tdh* 基因的菌株为 gw11、gw17、gyt5、Jzc3、Jzc4、zhy1、zhy5。该7株菌株分别分离自海瓜子和牡蛎(gw11、gw17和gyt5)、虾类(Jzc3和Jzc4)、蟹类(zhy1)及鱼类(zhy5)。而 *trh* 基因的电泳图显示,未有与阳性对照一致的条带出现,因此表明了45株副溶血性弧菌中均未检出 *trh* 基因。

### 2.4 血清型分析结果

45株副溶血性弧菌经血清凝集,结果共分出7个血清群,由表4可知,分别为O1群占2.2%(1/45)、O3群占24.4%(11/45)、O4群占15.6%(7/45)、O5群占20.0%(9/45)、O9群占4.4%(2/45)、O10群占8.9%(4/45)、O11群占26.7%(12/45),分析结果统计见表4。

表4 副溶血性弧菌分离株溶血基因和O抗原类型鉴定结果

Tab. 4 Results of hemolysin genes identification and O serotyping

菌株	传统分离方法	PCR			O 抗原
		<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	
gw1	+	+	-	-	O5
gw2	+	+	-	-	O11
gw3	+	+	-	-	O11
gw4	+	+	-	-	O9
gw5	+	+	-	-	O3
gw6	+	+	-	-	O3
gw7	+	+	-	-	O4
gw8	+	+	-	-	O3
gw9	+	+	-	-	O5
gw10	+	+	-	-	O4
gw11	+	+	+	-	O11
gw12	+	+	-	-	O11
gw13	+	+	-	-	O10
gw14	+	+	-	-	O4
gw15	+	+	-	-	O5
gw16	+	+	-	-	O4
gw17	+	+	+	-	O3

续表 4

菌株	传统 分离方法	PCR			O 抗原
		<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	
gw18	+	+	-	-	05
gw19	+	+	-	-	011
gyt1	+	+	-	-	04
gyt2	+	+	-	-	011
gyt3	+	+	-	-	04
gyt4	+	+	-	-	05
gyt5	+	+	+	-	04
gyt6	+	+	-	-	010
Jzc1	+	+	-	-	05
Jzc2	+	+	-	-	010
Jzc3	+	+	+	-	011
Jzc4	+	+	+	-	011
Jzc5	+	+	-	-	09
Jzc6	+	+	-	-	03
Jzc7	+	+	-	-	05
Yhy1	+	+	-	-	03
Yhy2	+	+	-	-	03
Yhy3	+	+	-	-	01
Yhy4	+	+	-	-	05
Yhy5	+	+	-	-	010
Yhy6	+	+	-	-	011
Yhy7	+	+	-	-	03
zhy1	+	+	+	-	011
zhy2	+	+	-	-	011
Zhy3	+	+	-	-	011
Zhy4	+	+	-	-	05
Zhy5	+	+	+	-	03
Zhy6	+	+	-	-	03
Cyc1	+	-	ND	ND	
Cyc2	+	-	ND	ND	
Cyc3	+	-	ND	ND	
Cyc4	+	-	ND	ND	

+ 出现, - 不出现, ND 未检出

## 2.5 统计分析

2009年5~10月,对市场上销售的贝类、海鱼、虾、蟹等20种水产品进行致病性弧菌调查,共采集161份样品,检出副溶血性弧菌45株,平均检出率为27.95%。从表5可看出,不同种类水产品中 $V_p$ 的检出率有显著性差异( $X^2 = 11.20, 0.01 < p < 0.05$ ),其中虾类与蟹类的检出率较高,分别高于 $V_p$ 平均检出率的18.93%~14.91%。贝类品种繁

多,不同贝类的检出率差异很大,其中牡蛎的检出率高于贝类平均检出率33.61%,高于整个水产品检出率29.19%。贝类与虾类检出率差异显著,而贝类与鱼类、头足类、蟹类的检出率差异不显著( $X^2_{\text{贝类/虾类}} = 6.43, 0.01 < p < 0.05$ ;  $X^2_{\text{贝类/鱼类}} = 0.03, p > 0.05$ ;  $X^2_{\text{贝类/蟹类}} = 1.31, p > 0.05$ ;  $X^2_{\text{贝类/头足类}} = 1.82, p > 0.05$ );虾类与头足类检出率差异显著,虾类与鱼类、蟹类的检出率差异为不显著( $X^2_{\text{虾类/头足类}} = 4.65, 0.01 < p < 0.05$ ;  $X^2_{\text{虾类/鱼类}} = 2.65, p > 0.05$ ;  $X^2_{\text{虾类/蟹类}} = 0.04, p > 0.05$ );鱼类与蟹类、头足类,及蟹类与头足类差异均为不显著( $X^2_{\text{鱼类/蟹类}} = 1.05, p > 0.05$ ;  $X^2_{\text{鱼类/头足类}} = 1.51, p > 0.05$ ;  $X^2_{\text{蟹类/头足类}} = 3.34, p > 0.05$ )。

表 5 5 大类水产品中  $V_p$  检出情况Tab. 5 Status of  $V_p$  detected from five sorts of aquatic products

样品种类	样品数	检出数	检出率/%
贝类	102	24	23.53
虾类	32	15	46.88
蟹类	7	3	42.86
鱼类	14	3	21.43
头足类	6	0	0
合计	161	45	27.95

## 3 结 语

作者采集的样品来自鱼、虾、贝、蟹、头足5类20种共161份,时间为5~10月份,是 $V_p$ 生长繁殖的最佳时期,也是往年上海地区由副溶血性弧菌引起食物中毒的高发季节,采集的样品和时间极具代表性。研究显示,副溶血性弧菌( $V_p$ )平均检出率为27.95%。与周边地区相比,上海安秀华<sup>[4]</sup>等分离的水产品副溶血性弧菌平均检出率高出10.51%,更低于华东沿海地区海产品副溶血性弧菌检出率<sup>[5]</sup>(57.4%~66.5%);与石亚素<sup>[6]</sup>等对舟山农贸市场水产品 $V_p$ 检出率相比,13.99%。引起的差异原因可能由于样品来源不同。据调查,本研究中的样品大部分为进口。在运输的过程中,低温保藏空运到本地后,直接培养于净水中,并对温度进行调控;而同类研究中所使用的样品来源于普通农贸市场或养殖场,未经过低温保藏直接投放于市场。从统计学意义来看,贝类、甲壳类 $V_p$ 污染尤其突出。贝类是滤过性摄食,并且多生活在海底泥沙中,使得它们体内得到 $V_p$ 的“浓缩”而带菌率相对较

高<sup>[7]</sup>。本研究的结果与刘秀梅<sup>[8]</sup>等2003年对国内沿海4个省份(浙江、江苏、广东、福建)甲壳类、贝类 *Vp* 污染状况的监测结果相符。因此,甲壳类(虾类、蟹类等)和贝类水产品中 *Vp* 的污染最为不可忽视。

众所周知, *tdh* 和 *trh* 基因已确认为是存在副溶血性弧菌中的主要毒力基因<sup>[9]</sup>, 是和副溶血性弧菌致病性密切相关的基因。本研究表明, 绝大多数水产品中的 *Vp* 不携带 *tdh* 基因, 而未检出 *trh* 基因。含有 *tdh* 基因的 *Vp* 分布在甲壳类和贝类中。在平均 6~7 个水产品中含有 1 个带有毒力基因 *tdh*。有研究表明, 从外环境中分离的 *Vp* 菌株, *tdh* 及 *trh* 基因的检出率极低<sup>[10]</sup>, 但并不意味着其不是造成食源性疾病发生的重要流行病学因素。作者没有检测到 *trh* 基因, 对含 *Vp* 毒力基因的水产品

数量是不够风险评估。

45 株分离菌株经鉴定分为 7 个血清型。以 O3 群、O11 群为主, O5 群、O10 群其次, 是主要的血清型。其中, 徐奋奋等对分离至宁波市小水产品的 27 株 *Vp* 进行了血清群分析, 主要血清群为 O4 群, O3 群、O2 群、O11 群次之; 叶茂华对丽水市贝类产品中副溶血性弧菌的血清分型以 O4, O3, O11 为主, 与本研究一致。说明本地区市售水产品中携带的 *Vp* 血清群的多样性。统计结果来看, 从贝类、虾类中分离出的 *Vp* 含有毒力基因 *tdh* 菌株的血清型均为 O3 群、O4 群、O11 群, 鱼类中含 *tdh* 的菌株血清型为 O3 群。结果表明, 有水产品引起各种感染的潜在性, 对其毒力基因的分布和血清型分布的认识, 有利于预防和控制该菌引起的疾病发生。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] 王璐华, 宁喜斌. 副溶血性弧菌的温度预测模型[ J ]. 食品与生物技术学报, 2009, 28( 2 ): 262- 266.  
WANG Lu hua, NING Xi bin. Predictive model for effect of temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*[ J ]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28( 2 ): 262- 266. ( in Chinese )
- [ 2 ] 杨正时, 房海主编. 人与动病原细菌学[ M ]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2003: 609- 622.
- [ 3 ] Angela Di Pinto, Giuseppina Ciccarese, Rita De Corato, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish[ J ]. **Food Control**, 2008, ( 19 ): 1037- 1041.
- [ 4 ] 田明胜, 郑雷军, 彭少杰, 等. 2000-2007 年上海市副溶血性弧菌致集体性食物中毒分析及对策[ J ]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20( 6 ): 415- 715.  
TIAN Ming sheng, ZHENG Lei jan, PENG Shao jie, et al. Analysis and measures on collective food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai Municipality. during 2000-2007[ J ]. **Chinese Journal of Zoonoses**, 2008, 20( 6 ): 415- 715. ( in Chinese )
- [ 5 ] 安秀华, 宁喜斌. 上海市市售水产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及耐药性研究[ J ]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25( 7 ): 657- 659.  
An Xiu hua, Ning Xi bin. Isolation, identification and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquatic products in Shanghai Markets[ J ]. **Chinese Journal of Zoonoses**, 2009, 25( 7 ): 657- 659. ( in Chinese )
- [ 6 ] 石亚素, 张行钦, 薛超波, 等. 舟山海产品副溶血性弧菌污染及毒力基因分析[ J ]. 中国公共卫生, 2007, 23( 9 ): 1135- 1136.  
SHI Ya su, ZHANG Xing qin, XUE Chao bo, et al. Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* contamination and toxicity from the marine products in Zhoushan[ J ]. **Chinese Journal of Public Health**, 2007, 23( 9 ): 1135- 1136. ( in Chinese )
- [ 7 ] 江海洋, 李磊, 莫宝庆, 等. 连云港市食用贝类副溶血性弧菌污染状况调查[ J ]. 职业与健康, 2008, 24( 20 ): 21- 28.  
JIANG Hai yang, LI Lei, MO Bao qing et al. Investigation on contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in edible shellfish in Lianyungang City[ J ]. **Occup an Health**, 2008, 24( 20 ): 21- 28. ( in Chinese )
- [ 8 ] 刘秀梅, 程苏云, 陈艳, 等. 2003 年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[ J ]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17( 2 ): 97- 99.  
LIU Xiu mei, CHENG Su yun, CHEN Yan, et al. Active surveillance on *Vibrio parahaemolyticus* in retail seafoods from coastal areas of China in 2003[ J ]. **Chinese Journal of Food Hygiene**, 2005, 17( 2 ): 97- 99. ( in Chinese )
- [ 9 ] Yi Cheng Su, Cheng chu Liu. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety[ J ]. **Food Microbiology**, 2007, 24( 6 ): 549- 558.
- [ 10 ] Shirai H, Ito H, Hirayama T, et al. Molecular epidemiologic evidence from association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis[ J ]. **Infect Immun**, 1990, 58: 3568- 3573.