

验,除血常规和生化指标之外,仅做了免疫球蛋白和外周血 T 淋巴细胞分类等免疫相关指标,这是本研究的不足之处。鉴于目前我国尚未建立转基因动物的食用安全性评价程序和方法^[9],今后如能获得更丰富的转 sFat-1 基因猪肉样品,通过选择更敏感的动物模型如大鼠 90 天喂养实验和更进一步的血清学、细胞学、免疫组化技术等,以便在转基因动物的营养学、食用安全性和生物学功效方面进行更系统全面的评价^[10]。

参考文献

- [1] Crawford M A. Docosahexaenoic acid in neural signaling systems [J]. *Nutr Health*, 2006, 18: 263-276.
- [2] Woodman R J, Mori T A, Burke V, et al. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients [J]. *Atherosclerosis*, 2003, 166(1): 85-93.
- [3] Kew S, Banerjee T, Minihane A M, et al. Lack of effect of foods enriched with plant-or marine- derived n-3 fatty acids on human immune function [J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77: 1287-1295.
- [4] 肖红卫,李莉,郑新民,等. 原核注射法获得转 ω -3 基因猪 [A] // 2008 年湖北畜牧兽医文集 [C]. 武汉: 湖北科技出版社, 2008: 322-331.
- [5] 华文君,刘西梅,程妮,等. 转 sFat-1 基因猪生理生化指标与繁殖性能测定 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(32): 18235-18236.
- [6] Calder P C. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acid [J]. *Proc Nutr Society*, 1996, 55: 737-774.
- [7] 郑国强,刘安军,滕安国,等. 雌雄小鼠胸腺和脾脏的免疫比较 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(16): 9743-9745.
- [8] Barlow S M, Greig J B, Bridges J M. Hazard identification by methods of animal-based toxicology [J]. *Food Chemical Toxicol*, 2002, 40(2-3): 145-191.
- [9] 张晓鹏,李宁. 转基因动物的食用安全性评价 [J]. *国外医学 (卫生学分册)*, 2006, 33(4): 250-253.
- [10] Kleter G A, Kok E J. Safety assessment of biotechnology used in animal production, including genetically modified (GM) feed and GM animals [J]. *Animal Science Papers and Reports*, 2010, 28(2): 105-114.

研究报告

两起副溶血性弧菌食物中毒血清学溯源结果分析

俞慕华,鞠长燕,王婷,黄锐敏

(深圳市南山区疾病预防控制中心,广东深圳 518054)

摘要:目的 对两起副溶血性弧菌(VP)引起的食物中毒进行血清学溯源,分析可疑食品和病人样品中菌株血清型之间的关系。方法 依据 GB/T4789.7—2008 方法,对检出的 VP 做血清分型、溶血素试验;PCR 扩增 VP 直接耐热溶血素基因(*tdh*)、*tdh* 相关溶血素基因(*trh*)和毒素调控基因(*toxR*)。结果 通过增加样品中可疑菌落数量的鉴定,两起食物中毒共检出 9 种 VP 血清型,主要有 O3: K6 型 13 株, O2: K28 型 6 株, O1: K56 型 2 株,其它各 1 株;两起食物中毒中分离的 27 株 VP 有 17 株 *tdh* 基因检测阳性,与溶血试验结果一致。结论 增加可疑菌落数鉴定,有助于 VP 食物中毒的溯源;虽然 O3: K6 血清型是引起食物中毒的主要病原菌,但不同样品来源的 VP 血清型呈现多样性;副溶血性弧菌 *tdh* 基因检测等同于溶血试验来鉴定 VP 致病性。

关键词:食物中毒;副溶血性弧菌;血清鉴定;溯源

中图分类号:R378.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0144-04

Analysis of serologic traceability results in two cases of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus*

Yu Muhua, Ju Changyan, Wang Ting, Huang Ruimin

(Center for Disease Control and Prevention, Nanshan, Guangdong Shenzhen 518054, China)

Abstract: Objective To trace the serological source of two food poisoning cases caused by *Vibrio parahaemolyticus* (VP) and analyze the relationship between serotypes in the suspect food and patient samples. **Methods** Based on the GB/T 4789.7 - 2008 method, the detected VP was serotyped, and hemolysin tests were performed. The directly heat-resistant hemolysin gene (*tdh*), *tdh*-related hemolysin gene (*trh*) and toxins regulated genes (*toxR*) were amplified by

PCR. Results 9 VP serotypes in two food poisoning cases were identified by expanding the identification of suspicious colonies in the sample. There were 13 strains of O3: K6, 6 strains of O2: K28, 2 strains of O1: K56. The results of *tdh* gene detection were positive in 17 strains from 27 isolated VP strains which were consistent with the hemolysin tests.

Conclusion Expanding the identification of suspicious colonies contributed to the traceability of food poisoning caused by VP. Although O3: K6 was the major pathogen causing food poisoning, VP serotypes from different samples show diversity. The *tdh* gene detection is equivalent to the hemolysis test in detecting the VP pathogenicity.

Key words: Food poisoning; *Vibrio parahaemolyticus*; serologic identification; source tracing

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是食源性疾病的主要病原菌之一, 主要分布于水产品尤其是海产品中^[1-2], 是引起沿海地区食物中毒的最主要病原菌。近几年发生的食物中毒及感染性腹泻大多数是由 VP 引起的 (占 60%)^[3-4], 且分离的 VP 较多为单一型, 同时也发现有多型别 VP 引起的食物中毒^[5], 为了溯源可疑食品和病人分离株之间关系, 本研究对两起食物中毒增加可疑菌落数量和血清型别进行鉴定, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品来源于辖区内发生的两起食物中毒, 第一起发生在 2010 年 5 月 21 日, 采样 12 份, 其中剩菜 3 份 (长沙口味虾、青椒焖鹅、水煮鱼), 病人肛拭子 9 份; 第二起发生在 2010 年 10 月 14 日, 采样 11 份, 其中食品 2 份 (卤鸡蛋、卤鸡腿汁), 涂抹样 3 份, 肛拭子 6 份。

1.1.2 主要仪器与试剂

PCR 扩增仪 (Barlworld)、荧光定量 PCR 仪 (ABI)、3% 氯化钠碱性蛋白胨 (北京陆桥)、弧菌显色平板 (科玛嘉)、VP 诊断血清 (日本生研公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离、血清鉴定

按中华人民共和国国家标准 GB/T4789.7—2008 进行。

1.2.2 VP 特异基因检测

普通 PCR 扩增 VP 直接耐热溶血素基因 (*tdh*)、*tdh* 相关溶血素基因 (*trh*) 和毒素调控基因 (*toxR*), 引物序列及扩增片段长度分别是: *tdh1f*: AATACCC AAGCTCCGGTCAATG, *tdh1r*: ACCGCTCTTATAGCC AGACACC, 片段长度 195 bp; *trh3f*: TTAACCATTTT GAGCCTGAAGT, *trh3r*: ACCATCCATACCTTTTCCT TCT, 片段长度 191 bp; *toxRf*: ATTCGCTCGCTGACCA ACAAAG, *toxRr*: ACGCAGAGTAGAAATCGCTTGA, 片段长度 174 bp。

2 结果

2.1 耐盐试验和生化反应

第一起食物中毒样品每份挑取可疑菌落 20 个, 第二起食物中毒样品每份挑取可疑菌落 10 个分别接种到 0%、6%、8%、10% 氯化钠蛋白胨水中, 经培养可疑菌在 6%、8% 氯化钠蛋白胨水中生长良好, 0%、10% 氯化钠蛋白胨水中不生长。对符合耐盐试验的 VP 菌株进行生化反应鉴定, 结果除 2 份病人肛拭子外, 均检出 VP (表 1、2)。

表 1 第一起食物中毒副溶血性弧菌菌落血清分型结果

Table 1 *Vibrio parahaemolyticus* serotyping results of the first food poisoning case

样品	菌落血清型																			
长沙口味虾	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	/	/	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28
青椒焖鹅	K28	K28	K34	K28	K28	/	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28
水煮鱼	K28	K28	K28	K28	K12	/	/	K28	/	/	K28	K25	/	/	K28	K28	K25	K28	/	K28
病人肛拭子	K6	K6	K6	K6	K6	/	/	/	K6	K6	K6	K6	/	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6
病人肛拭子	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	/	K6	K6	K6	K6	K6	K6
病人肛拭子	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6
病人肛拭子	K6	K6	K6	K6	/	K6	K6	K6	/	K6	K6	K6	/	K6	/	/	/	K6	K6	/
病人肛拭子	K28	K6	K6	K6	K28	K28	K6	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28	K28
病人肛拭子	K6	K6	K6	/	K28	K6	K28	/	K6	K6	/	/	/	K6	K28	K6	K6	K6	K6	/
病人肛拭子	K6	K6	K28	K28	K6	/	/	/	/	K6	/	/	/	K6	K6	/	K6	/	/	/
病人肛拭子	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
病人肛拭子	K6	K6	K6	/	K6	/	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6

注: K28 代表 O2: K28, K12 代表 O4: K12, K25 代表 O3: K25, K6 代表 O3: K6, K34 代表 O4: K34, “/” 表示不符合耐盐试验、生化反应, 不做血清鉴定。

表2 第二起食物中毒副溶血性弧菌菌落血清分型结果

Table 2 *Vibrio parahaemolyticus* serotyping results of the second food poisoning case

样品	菌落血清型									
	K19	K19	K6	K19	K6	K6	K19	K6	K19	K6
卤鸡蛋	K19	K19	K6	K19	K6	K6	K19	K6	K19	K6
卤鸡腿汁	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
卤鸡腿菜盘涂抹样	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
切鸡蛋刀涂抹样	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
卤鸡蛋盘涂抹样	K6	K56	K56	K56	K6	K6	K6	K6	K6	K6
病人肛拭子	K6	K56	K6	K56	K6	K6	K56	K6	K6	K6
病人肛拭子	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
病人肛拭子	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6
病人肛拭子	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6	K6
病人肛拭子	K8	K8	K8	K8	K8	K8	K8	K8	K8	K8
病人肛拭子	K36	K36	K36	K36	K36	K36	K36	K36	K36	K36

注:K19代表 O11; K19, K6代表 O3; K6, K56代表 O1; K56, K8代表 O4; K8, K36代表 O11; K36, “/”表示不符合耐盐试验、生化反应,不做血清鉴定。

2.2 血清凝集试验

对符合耐盐、生化试验的 VP 进行血清分型,发现第一起食物中毒 12 份样品中检出 VP O3: K6 型 8 份(病人肛拭子为主)、O2: K28 型 6 份(食品来源为主)、O3: K25 型、O4: K12 型和 O4: K34 型各 1 份,其中多份样品检出两个以上血清型(表 1)。第二起食物中毒 11 份样品中检出 VP O3: K6 型 5 份(病人肛拭子为主)、O1: K56 型 2 份、O11: K19 型、O4: K8 型和 O11: K36 型各 1 份(表 2)。

2.3 神奈川试验

对从两起食物中毒共检出的 27 株 VP 进行溶血素检测,结果 O3: K6、O11: K36、O4: K8、O1: K56 型 VP 全部溶血, O2: K28、O4: K12、O4: K34、O3: K25、O11: K19 型 VP 均不溶血(表 3)。

2.4 VP 特异基因检测

27 株 VP 经 PCR 检测,第一起食物中毒的 3 份食品样分离的 6 株 VP *tdh* 基因均为阴性,而从病人肛拭子中分离的 11 株 VP,除 3 株 O2: K28 血清型 *tdh* 基因为阴性外,其余 8 株 VP *tdh* 基因均为阳性。第二起食物中毒分离的 10 株 VP,除从 1 份食品样中分离的 O11: K19 血清型 *tdh* 基因为阴性外,其余血清型所有 VP *tdh* 基因均为阳性。且 *tdh* 基因检测结果和溶血素试验结果一致(表 3)。

3 讨论

从这两起食物中毒细菌分离结果看,增加可疑菌落鉴定数量,可以分离到多种不同型别 VP,既有近年来常见的 K6,亦有较为少见的 K34、K12、K25、K19、K56、K8、K36 型,说明这两起食物中毒的病原复杂,为多种型别 VP 的混合感染。这与以往报导较多的由单一型别 VP 引起的食物中毒不同^[6],说明 VP 多种血清型广泛存在于自然界中。本文增加可疑菌落血清鉴定,发现挑取 2 个或 5 个可疑菌落,其结果完全不同,而继续增加菌落鉴定数量,对鉴

表3 27株 VP *toxR*、*trh*、*tdh* 及溶血素检测结果

Table 3 Results of *toxR*、*trh*、*tdh* gene detection and hemolysin test of 27 VP strains

样品来源	血清型	<i>toxR</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>	溶血试验
第一起食物中毒					
长沙口味虾	O2: K28	+	-	-	-
青椒焖鹅	O2: K28	+	-	-	-
	O4: K34	+	-	-	-
水煮鱼	O2: K28	+	-	-	-
	O4: K12	+	-	-	-
	O1: K25	+	-	-	-
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O2: K28	+	-	-	-
	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
	O2: K28	+	-	-	-
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
	O2: K28	+	-	-	-
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
	O2: K28	+	-	-	-
第二起食物中毒					
卤鸡蛋	O11: K19	+	-	-	-
	O3: K6	+	-	+	+
卤鸡蛋盘涂抹	O3: K6	+	-	+	+
	O1: K56	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
	O1: K56	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O3: K6	+	-	+	+
病人肛拭子	O4: K8	+	-	+	+
病人肛拭子	O11: K36	+	-	+	+

定结果已无影响。从表 1 看,挑取 2 个可疑菌落,在剩余食物和病人肛拭子样品中,找不到同一种血清型相符的菌株,当增加挑取 3~5 个可疑菌落时,病人肛拭子样品中则检出 3 株与剩余食物一致的 O2: K28 型菌,所以在对食物中毒进行溯源时,需要适当增加可疑菌落鉴定数量。

神奈川反应是鉴定 VP 致病力的传统溶血性试验,步骤繁琐。本研究对分离的 27 株 VP 做毒力基

因 *tdh* 和 *trh* 检测,结果 *tdh* 阳性菌株溶血试验均为阳性,符合率 100%,故认为 *tdh* 基因检测等同于溶血试验来检测 VP 致病性。另外,从水产品剩菜和病人肛拭子分离的 6 株 O2: K28 型 VP *tdh* 均为阴性,说明第一起食物中毒是由 O3: K6 型 VP 引起,但在食品样中又未能检出 O3: K6 型。据程苏云等^[7]报道在外环境及水产品等检出的菌株以 O1、O4、O5 群为主,在 806 株的副溶血性弧菌中只检出 2 株 O3: K6 型,仅占 0.25%,说明 O3: K6 在外环境及水产品中检出率并不高。Nair 等^[8]也发现类似现象,提出“血清型变异”假说,推测 O3: K6 型 VP 抗原位点受环境等因素的影响易发生突变。另外,金莉莉等^[9]通过 REP-PCR 和 ERIC-PCR DNA 指纹图谱发现,血清型 O1 群与血清型 O3 群的菌株主要条带非常相似,当前流行的 O3 群菌株与 O1 群菌株亲缘关系密切。而本研究分离的 O3: K6 菌株与 O2: K28 菌株是否具有相似的分子特征,有待进一步基因水平的研究。

参考文献

[1] 许如苏,林彩华,黄桂荣,等. 副溶血性弧菌快速测试片检测

性能研究[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(12):2621-2622,2738.

[2] 余超,李迎月,林晓华,等. 广州市 2006—2009 年水产品副溶血性弧菌监测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(2):170-173.

[3] 袁月明,黄锐敏,陈辉,等. 南山区 2004 年细菌性食物中毒检验结果与分析[J]. 预防医学情报杂志,2007,23(4):86-87.

[4] 黄锐敏,陈辉,温群文,等. 深圳市南山区 2007 年细菌性食物中毒结果分析[J]. 河南预防医学杂志,2008,19(5):375-376.

[5] 侯炎昌,杨晓华,肖娜,等. 一起多种型别副溶血性弧菌引起食物中毒的实验室检测[J]. 热带医学杂志,2007,7(4):384-385,392.

[6] 张蔚,潘劲草,陈坤,等. 杭州地区 2000—2002 年副溶血性弧菌的分子分型研究[J]. 中华流行病学杂志,2006,27(4):343-346.

[7] 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):1141-1142.

[8] Nair G B, Ramamurthy T, Bhattacharya S K, et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants[J]. Clin Microbiol Rev,2007,20(1):39-48.

[9] 金莉莉,董雪,王秋雨,等. 副溶血性弧菌重复序列-PCR 分型研究[J]. 微生物学通报,2008,35(3):389-394.

《中国食物与营养》2013 年征稿征订启事

中国科技核心期刊 中国农业核心期刊

《中国食物与营养》创办于 1995 年,由农业部主管,中国农业科学院、国家食物与营养咨询委员会主办的食物与营养领域相结合的综合性月刊,国内外公开发行。

办刊宗旨:立足于农业、食物、营养领域的结合,报道国家在食物与营养相关领域的方针、政策、法规、标准等;刊登食物生产、食物消费、食品工业、食物营养等方面的发展动态和科技成果;普及宣传营养保健、膳食指南等方面的知识等。

本刊主要栏目有:专题论坛、食物安全、资源与生产、食品工业、消费与流通、新技术新产品、营养与保健、膳食营养调查等。

欢迎大家踊跃投稿和订阅《中国食物与营养》杂志。《中国食物与营养》杂志由北京报刊发行局发行,邮发代号为 82-597。本刊为月刊,每期定价 15 元,全年 180 元。也可直接汇款到编辑部订阅(免费邮寄)。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号《中国食物与营养》编辑部

电话:(010)82109761 传真:(010)82106285 邮编:100081

网址:www.sfnc.org.cn

E-mail:foodandn@263.net