

调查研究

2012—2013年供澳门水产品中致病性弧菌污染状况调查

滕勇勇¹ 莫秋华² 王琪² 唐明慧² 吴雷³ 姚月嫻³ 陈惠芳³ 杨泽² 陈清³ 孙虹²(1. 珠海市慢性病防治中心 广东 珠海 519000; 2. 珠海国际旅行卫生保健中心 广东 珠海 519020;
3. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院流行病学系 广东 广州 510515)

摘要:目的 了解供澳门水产品中致病性弧菌的污染状况和三间分布。方法 2012年8月—2013年7月,采用随机抽样的方法收集珠海、中山两地的供澳水产品样品1 510份,利用基于HAND系统多重PCR方法初筛后采用常规分离培养和生化鉴定验证,分析其污染状况、季节性、地域性以及水产品种类的分布。结果 供澳水产品样品中弧菌阳性率为59.5% (898/1 510),复合感染率为37.3% (563/1 510)。一年中的5~11月份致病性弧菌总阳性率较高,1月和12月阳性率较低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。珠海地区致病性弧菌总阳性率(69.5%)高于中山(51.9%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。贝类的致病性弧菌总阳性率(70.6%)高于鱼类(54.4%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 供澳门水产品中致病性弧菌污染现象严重,需加大致病性弧菌的监测力度,以防致病性弧菌的感染和流行。

关键词: 澳门; 水产品; 食源性致病菌; 致病性弧菌; 污染; 食品安全

中图分类号: R155; R378.3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0180-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.019

Contamination status of pathogenic *Vibrios* in aquatic products exporting to Macao from 2012 to 2013

TENG Yong-yong, MO Qiu-hua, WANG Qi, TANG Ming-hui, WU Lei, YAO Yue-xian,
CHEN Hui-fang, YANG Ze, CHEN Qing, SUN Hong
(Zhuhai Center for Chronic Disease Control Guangdong, Guangdong Zhuhai 519000, China)

Abstract: Objective To find out the contamination status and distribution of pathogenic *Vibrios* in aquatic products exporting to Macao. **Methods** A random sampling method were used to collect samples from Zhuhai and Zhongshan. Samples were preliminary screened by multiplex PCR based on HAND system and confirmed by traditional culture and biochemical identification. The contamination status and seasonal, regional and species distribution were finally analyzed. **Results** Compared with 37.3% coexistent infection rate, the positive rate of *Vibrios* in aquatic samples was 59.5%. The positive rate of pathogenic *Vibrios* from May to November was significantly higher than that of January and December. The overall positive rate in Zhuhai district was 69.5%, higher than that in Zhongshan (51.9%) and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The overall positive rate of shellfish was 70.6%, higher than that of fish (54.4%) and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The contamination status of pathogenic *Vibrios* was serious in aquatic products exporting to Macao and needed to monitor to prevent infection.

Key words: Macao; aquatic products; foodborne pathogens; pathogenic *Vibrios*; contamination; food safety

弧菌(*Vibrios*)是一类菌体短小,不产生孢子的弧状或逗点状革兰阴性菌,广泛分布于河口、海湾、

近岸海域的海水中和海洋动物体内^[1]。弧菌共有100多种,多数为非致病菌,只有少数对人类有致病性如霍乱弧菌(*Vibrio cholera*, VC)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*, VV),还有一些是条件致病菌,如拟态弧菌(*Vibrio mimicus*, VM)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*, VA)等^[2]。水产品中的鱼类和贝类是这些致病性弧菌的主要携带者,人类可以通过食用被污染的水产品而引起急性胃肠炎和败血症等疾病,对人类健康造成威胁。如霍乱弧菌(O1和O139群),一旦通过污染海、水产品进入体内,就会导致

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 国家传染病科技重大专项“家传染病监测技术平台”子项目(2009ZX10602-02); 珠海检验检疫局科技计划项目(ZH2013-4)。

作者简介: 滕勇勇 男 硕士生 研究方向为分子流行病学
E-mail: gztengyy@163.com

通讯作者: 孙虹 女 副教授 研究方向为分子流行病学
E-mail: sunhong0703@163.com

陈清 女 教授 研究方向为分子流行病学
E-mail: qingchen@fimmu.com

霍乱弧菌感染,而且该病发病急、传播快,甚至可引起暴发或流行,严重者在短时间内引起脱水和电解质平衡失调,发展为循环衰竭,最终导致死亡。因此,开展致病性弧菌的污染状况调查意义重大。珠海、中山两地是供澳门水产品的主要基地,属沿海亚热带地区,本研究拟对两地供澳水产品中霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌和溶藻弧菌进行污染状况调查研究,为致病性弧菌感染的发生和流行提供科学有效的预警信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集与处理

2012年8月—2013年7月,采用随机抽样的方法,在珠海拱北口岸由专门技术人员对珠海、中山两地的鱼类(鲮鱼、鲳鱼、鲈鱼、鲮鱼、鲑鱼、马头鱼等11种)和贝类(牡蛎、蛤蜊、蛭子、贻贝)每月约抽取125份样品。样品处理的具体操作步骤如下:以无菌操作剪取用于检测的部分,鱼类剖取腮部和肠内容物及体表涂抹拭子,于3%氯化钠碱性蛋白胨水37℃增菌6~8h;贝类取壳内软组织,剪碎后,连同壳内液体搅拌均匀,然后取25g此混合物加入225ml 3%氯化钠碱性蛋白胨水37℃增菌6~8h。

1.1.2 主要仪器与试剂

全自动细菌生化仪(Vitek 2 compact 30,法国梅里埃)、PCR仪(9700,美国ABI)、可调移液器(德国Eppendorf)、高速离心机、生物安全柜;Buffer(10×)、dNTP mixture(2.5 mmol/L)、MgCl₂(25 mmol/L)、*r-Taq*(5 U/μl)、DNA ladder Marker(100 bp)均购自大连TaKaRa,细菌DNA提取试剂盒(TIANDZ Column bacteria DNAout Kit,北京天恩泽有限公司),DMSO(D2650,美国Sigma),琼脂糖(16500500,英国Invitrogen),TCBS培养基(上海士锋有限公司)。

1.2 方法

首先采用基于同源加尾(homo-tag assisted non-dimer, HAND)系统多重PCR方法(原理参见文献[3])对收集样品进行初筛,将初筛阳性样品经细菌分离培养和生化鉴定以验证。具体步骤如下:样品增菌后(增菌液会产生较明显的絮状生长物或者表层有菌膜生长),用灭菌接种环从增菌液表层取1接种环培养物,分区划线接种于TCBS培养基或者科玛嘉弧菌显色培养基上,置37℃培养18~24h,挑取单个可疑菌落利用全自动细菌生化分析仪进行菌株鉴定。此外,由于TCBS培养基的菌落在诊断血清中难以乳化,需转种到普通营养琼脂培养基上。因此,将接种于TCBS培养基上且初筛为霍乱

弧菌阳性的菌株,再次转种到普通营养琼脂培养基上,然后进行O1群和O139群混合的霍乱两价血清诊断,检出阳性时再用单价血清进一步鉴定。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0进行统计,定性资料进行 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

共收集1510份水产品样品,检出阳性样品898份,弧菌阳性率为59.5%;复合感染样品563份,复合感染率37.3%,其中副溶血性弧菌和溶藻弧菌复合感染样品293份,占52.0%(293/563),详见表1;具体霍乱弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌和溶藻弧菌的阳性率分别为:21.8%(329/1510)、35.4%(535/1510)、3.7%(56/1510)、7.2%(108/1510)、40.5%(611/1510),其中霍乱弧菌中仅有2株O1群小川型,5株O1群稻叶型,其余为非O1、非O139群。

表1 致病性弧菌复合感染情况

Table 1 Coexistent information of pathogenic *Vibrios*

复合情况	检出数 /份	百分比 /%	复合情况	检出数 /份	百分比 /%
VC+VP+VV+VM+VA	3	0.5	VC+VP+VM	4	0.7
VC+VP+VV+VA	4	0.7	VP+VA	293	52.0
VC+VP+VV+VM	6	1.1	VC+VP	14	2.5
VC+VP+VM+VA	6	1.1	VC+VM	50	8.9
VC+VV+VM+VA	1	0.2	VP+VV	13	2.3
VC+VP+VA	97	17.2	VV+VM	1	0.2
VP+VM+VA	7	1.2	VP+VM	4	0.7
VC+VM+VA	1	0.2	VC+VA	30	5.3
VP+VV+VA	21	3.7	其他	5	0.9
VC+VP+VV	3	0.5	合计	563	100.0

注:VC为霍乱弧菌;VV为创伤弧菌;VP为副溶血性弧菌;VM为拟态弧菌;VA为溶藻弧菌

2.2 季节性分布

2012年8月—2013年7月期间,5种重要致病性弧菌不同月份的阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$),详见表2。霍乱弧菌的阳性率以5~10月较高,1、12月较低,其中O1群霍乱弧菌散在发生,4、7月各2株,8、9、11月各1株;副溶血性弧菌的阳性率以7、8、9月较高,1月较低;创伤弧菌的阳性率以7、8月较高,1月较低;拟态弧菌的阳性率以7~10月较高,1、2和12月较低;溶藻弧菌的阳性率以6~10月较高,12月最低;致病性弧菌的总阳性率以5~11月较高,1和12月份较低。图1为供澳门水产品中5种重要致病性弧菌的季节性分布图。

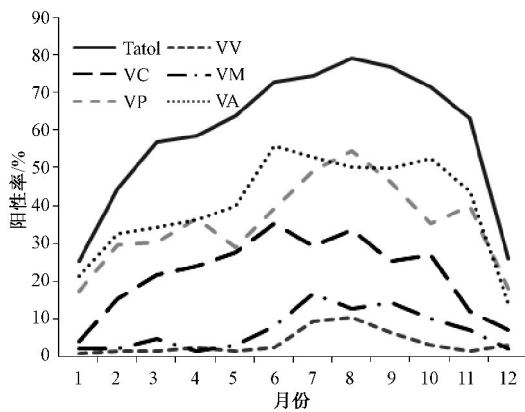
2.3 地域性分布

从表3可以看出,珠海、中山两地霍乱弧菌阳性

表 2 1~12 月 5 种重要致病性弧菌的检测结果

Table 2 Positive rate of important pathogenic *Vibrios* among Jan-Dec

月份	样品数/份	阳性数/份(阳性率/%)					
		总弧菌	霍乱弧菌	副溶血性弧菌	创伤弧菌	拟态弧菌	溶藻弧菌
1	126	32(25.4)	5(4.0)	22(17.5)	1(0.8)	3(2.4)	27(21.4)
2	125	56(44.8)	19(15.2)	37(29.6)	2(1.6)	3(2.4)	41(32.8)
3	125	71(56.8)	27(21.6)	38(30.4)	2(1.6)	6(4.8)	43(34.4)
4	126	74(58.7)	30(23.8)	46(36.5)	3(2.4)	2(1.6)	46(36.5)
5	127	81(63.8)	35(27.6)	37(29.1)	2(1.6)	4(3.1)	51(40.2)
6	125	91(72.8)	44(35.2)	49(39.2)	3(2.4)	10(8.0)	70(56.0)
7	126	94(74.6)	37(29.4)	62(49.2)	12(9.5)	21(16.7)	67(53.2)
8	125	99(79.2)	42(33.6)	68(54.4)	13(10.4)	16(12.8)	63(50.4)
9	126	97(77.0)	32(25.4)	58(46.0)	8(6.3)	18(14.3)	63(50.0)
10	127	91(71.7)	34(26.8)	45(35.4)	4(3.1)	13(10.2)	67(52.8)
11	125	79(63.2)	15(12.0)	50(40.0)	2(1.6)	9(7.2)	55(44.0)
12	127	33(26.0)	9(7.1)	23(18.1)	4(3.1)	3(2.4)	18(14.2)
合计	1 510	898(59.5)	329(21.8)	535(35.4)	56(3.7)	108(7.2)	611(40.5)



注: VC 为霍乱弧菌; VV 为创伤弧菌; VP 为副溶血性弧菌; VM 为拟态弧菌; VA 为溶藻弧菌

图 1 致病性弧菌的季节性分布

Figure 1 Seasonal distribution of important pathogenic *Vibrios*

率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,珠海霍乱弧菌阳性率 24.5% 高于中山的 19.7% ,其中 O1 群霍乱弧菌珠海 5 株、中山 2 株;珠海、中山两地副溶血性弧菌阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,珠海副溶血性弧菌阳性率 42.5% 高于中山的 30.1% ;珠海、中山两地创伤弧菌阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,珠海创伤弧菌阳性率 4.9% 高于中山的 2.8% ;珠海、中山两地拟态弧菌阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,尚不能认为两地拟态弧菌阳性率有差别;珠海、中山两地溶藻弧菌阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,珠海溶藻弧菌阳性率 51.5% 高于中山的 31.0% ;珠海、中山两地总弧菌阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,珠海致病性弧菌总阳性率 69.5% 高于中山的 51.9% 。

表 3 中山、珠海两地致病性弧菌的检测结果

Table 3 Regionally distribution of pathogenic *Vibrios*

产地	样品数/份	阳性数/份(阳性率/%)					
		总弧菌	霍乱弧菌	副溶血性弧菌	创伤弧菌	拟态弧菌	溶藻弧菌
珠海	649	451(69.5)	159(24.5)	276(42.5)	32(4.9)	54(8.3)	334(51.5)
中山	861	447(51.9)	170(19.7)	259(30.1)	24(2.8)	54(6.3)	267(31.0)

2.4 水产品种类分布

从表 4 可以看出,鱼类和贝类的 5 种致病性弧菌的阳性率差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ,鱼类中霍乱弧菌、拟态弧菌的阳性率分别为 25.9%、9.3% ,均高于贝类的 12.8%、2.5% ,其中 O1 群霍乱弧菌在鱼

类中 4 株,贝类 3 株;贝类中副溶血弧菌、创伤弧菌和溶藻弧菌的阳性率分别为 51.3%、5.5% 和 57.1% ,均高于鱼类的 28.1%、2.9%、32.8% ;且鱼类和贝类的总弧菌阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,贝类的弧菌阳性率 70.6% 高于鱼类的 54.4% 。

表 4 鱼类、贝类水产品中致病性弧菌的检测结果

Table 4 Species distribution of pathogenic *Vibrios*

种类	样品数/份	阳性数/份(阳性率/%)					
		总弧菌	霍乱弧菌	副溶血性弧菌	创伤弧菌	拟态弧菌	溶藻弧菌
鱼类	1 034	562(54.4)	268(25.9)	291(28.1)	30(2.9)	96(9.3)	339(32.8)
贝类	476	336(70.6)	61(12.8)	244(51.3)	26(5.5)	12(2.5)	272(57.1)

3 讨论

近年来,随着社会与经济的飞速发展以及人们

对食品安全的日益关注,水产品的安全问题也备受瞩目。与此同时,政府主管部门对水产品的质量和安全的重视程度与日俱增,对水产品中的致病微生物

物要求严格检验,禁止检出一切危害人类健康的致病因子。而致病性弧菌已经成为影响水产品安全问题的最常见也是最重要的一种致病因子。我国食源性疾病监控网络数据显示,在我国的一些沿海城市,由致病性弧菌引起的食物中毒事件呈明显上升趋势,尤其是副溶血性弧菌,已经超过沙门菌成为食源性疾病暴发的首要致病菌^[4-5]。为此,本研究对珠海、中山两地的供澳水产品中的致病性弧菌进行流行病学调查,结果分析如下:

3.1 一般情况分析

供澳水产品中 5 种重要致病性弧菌的总阳性率为 59.5% (898/1 510),复合感染率 37.3% (563/1 510)。可见,致病性弧菌是一种广泛分布在水产品中的微生物,且水产品中大多数是 2 种或 3 种致病性弧菌的多重污染,与冯家望等^[6]和金玉娟等^[7]的研究结论一致。有研究表明^[8-9],溶藻弧菌广泛分布于海水及海、水产品中,且数量在各海洋弧菌之中占居首位。在此次流行病学的调查中,也发现溶藻弧菌的阳性率居 5 种重要致病性弧菌的首位,为 40.5%。副溶血性弧菌的阳性率为 35.4%,位居二位,而该菌被认为是沿海地区食物中毒的主要病原菌,常因生吃由该菌污染的海、水产品而感染引起食物中毒,在美国、日本等发达国家中由该菌引起的食物中毒占首位^[10]。在其余 3 种致病性弧菌中,霍乱弧菌阳性率为 21.8%,但只有 7 株 O1 群霍乱弧菌,其余均为非 O1、非 O139 群的霍乱弧菌;拟态弧菌阳性率为 7.2%,该菌为条件致病菌,可造成腹泻病的散在发生;创伤弧菌的阳性率最低,为 3.7%,该菌可造成原发性败血症、胃肠道感染及伤口感染 3 种不同的临床表现,其发病率低,但病死率在过去的 30 年内由 10% 上升到 54%^[11]。对于霍乱,自 1817 年以来全球共发生 7 次世界性大流行,主要由 O1 或 O139 群流行株引起,然而本研究检测出的 7 株 O1 群霍乱弧菌均为非流行株,一般只造成散在的腹泻病例,但一些 O1 群霍乱弧菌非流行株可经过毒素基因的水平转移,从而成为流行株,故应对供澳水产品中的非流行株 O1 群霍乱弧菌也给予足够的重视,因此建议不要生吃或半生吃水产品,以防致病性弧菌的感染和流行。

3.2 季节性分析

季节性分布显示,在一年中的 5~11 月致病性弧菌总阳性率较高,而 1 和 12 月的致病性弧菌总阳性率较低。可见,供澳水产品中致病性弧菌主要在夏秋季流行。根据调查结果分析,水体温度是造成这种季节性分布重要因素。研究表明,当水体温度低于 10℃ 时,环境中致病性弧菌数量相对较低,而当水体

温度在 20~30℃ 之间时,环境中致病性弧菌数量比较丰富。本次流行病学调查的水产品属中山和珠海两地,而中山和珠海隶属广东省,为热带和亚热带季风气候区,素有“一年仅“冬夏”两季之称。在广东,冬季为 12 月到 2 月,其中 1 和 12 月为最冷月,气温一般在 10℃ 以下,抑制致病性弧菌的生长,故水产品中阳性率相对较低;而 2 月气温开始上升,一直到夏季的 7、8 月气温上升到最高,平均气温可达 28~29℃,为致病性弧菌的适宜生长温度,致病性弧菌大量繁殖,故在水产品中阳性率最高。而且到 10、11 月,广东的夏季延长,气温下降幅度不大,也造成 10 和 11 月致病性弧菌的阳性率较高。因此,夏秋季要加强水产品中致病性弧菌的监测,减少夏秋季由致病性弧菌引起食物中毒的发病率。

3.3 地域性分析

地域性分布显示,在供澳水产品中,来自珠海地区致病性弧菌的污染现象比中山地区严重,原因可能与珠海地区的地理条件有关。珠海是珠三角海洋面积最大、岛屿最多、海岸线最长的城市,相比中山地区,海水的反渗较为严重,水体环境中含的盐分较高。而盐分是影响致病性弧菌生长的一个重要参数,尤其是对于一些嗜盐性弧菌,如副溶血性弧菌和创伤弧菌。因此,珠海地区要加强水产品养殖业的管理,对水体环境中的盐度要严格控制,以抑制致病性弧菌的生长繁殖。

3.4 水产品种类分析

水产品种类分布显示,贝类中致病性弧菌的阳性率高于鱼类,可见贝类的弧菌污染较鱼类严重。根据调查结果推测,该现象可能跟贝类的摄食方式有关。本次流行病学调查的是牡蛎、蛤蜊、蛭子、贻贝 4 种贝类,属于双壳贝类,都是滤食性的摄食方式,通过水的吸入和吐出而滤取小型浮游生物,能将水环境中的致病性弧菌富集于体内,而鱼类的摄食大多数是以捕食和吸食的方式为主,起不到体内富集致病性弧菌的作用。因此,要加强对于贝类水产品中致病性弧菌的监测。

参考文献

- [1] Tantillo G M, Fontanarosa M, Di Pinto A, et al. Updated perspectives on emerging *Vibrios* associated with human infections [J]. *Lett Appl Microbiol* 2004, 39(2): 117-126.
- [2] Thompson F L, Iida T, Swings J. Biodiversity of *Vibrios* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68(3): 403-431.
- [3] 滕勇勇,莫秋华,王琪,等.基于同源加尾系统的 4 种腹泻病毒的多重 RT-PCR 检测方法[J].南方医科大学学报, 2013, 33(5): 724-727.
- [4] 刘弘,陆屹,高围激,等.2008 年上海市食源性疾病预防[J].中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 126-131.

[5] 李剑森,梁骏华,柯碧霞,等. 2012 年广东省食源性疾病监测结果分析[J]. 华南预防医学, 2013, 39(6):10-16.

[6] 冯家望,王小玉,李丹琳,等. 水产品中致病性弧菌污染状况研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(1):45-47.

[7] 金玉娟,甘莉萍,陈应坚,等. 深圳市龙岗区水产品和外环境水体中致病性弧菌污染调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6):1512-1514.

[8] Hervio-Heath D, Colwell R R, Derrien A, et al. Occurrence of pathogenic *Vibrios* in coastal areas of France [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92(6):1123-1135.

[9] Gopal S, Otta S K, Kumar S, et al. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 102(2):151-159.

[10] SU Y C, LIU C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety[J]. Food Microbiol, 2007, 24(6):549-558.

[11] TAO C H, CHEN C C, TAI S J, et al. Seasonality, clinical types and prognostic factors of *Vibrio vulnificus* infection [J]. J Infect Dev Ctries, 2013, 7(7):533-540.

· 标准工作动态 ·

欧盟发布部分食品中丁苯吗啉的最大残留限量

2015 年 3 月 18 日 欧洲食品安全局(EFSA) 发布消息 根据欧盟委员会法规(EC) No 396/2005 第 12 章, EFSA 审查了杀虫剂活性物质丁苯吗啉(Fenpropimorph) 在欧盟水平的现有最大残留限量(MRLs) 。据审查结果, 部分推荐修订的 MRL 值如下:

商品种类	现行 MRL/(mg/kg)	建议 MRL/(mg/kg)
胡萝卜、山葵、欧洲防风草、欧芹根、婆罗门参	0.05	0.04
燕麦	0.5	0.4
猪肉	0.02	0.02
猪肝	0.3	0.3
猪肾	0.05	0.05
牛肉	0.02	0.15
牛脂肪	0.01	0.2
牛肝	0.3	3
牛肾、绵羊肾	0.05	0.5
绵羊肉、山羊肉	0.02	0.15
绵羊脂肪	0.01	0.2
绵羊肝	0.3	3
山羊脂肪	0.01	0.2
山羊肝	0.05	3
山羊肾	0.01	0.5
家禽肉、家禽脂肪、家禽肝、猪脂肪; 鸟蛋	0.01	0.01
牛奶、绵羊奶、山羊奶	0.01	0.015

(来源: 国家质检总局)

(相关链接: http://www.aqsiq.gov.cn/xxgk_13386/zxxxgk/201503/t20150324_434946.htm)