

论著

宁波市小水产品中副溶血性弧菌的血清型、毒力及耐药性研究

徐奋奋¹ 徐景野² 宋启发² 裘立晓¹ 陈美芬¹ 金晓霞¹

(1. 江北区疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315020; 2. 宁波市疾病预防控制中心, 浙江 宁波 315016)

摘要:目的 了解宁波市小水产品中副溶血性弧菌血清群分布、产毒素特性及耐药性,为防治副溶血性弧菌引起的食源性疾病提供依据。方法 参照 GB/T 4789.7—2003 用标准血清和 PCR 进行分型,用 PCR 测定 *tdh* 和 *trh* 毒力基因;用纸片扩散法进行药敏试验。结果 27 株副溶血性弧菌分属于 9 个血清群,分别为 O 4 群占 33.3% (9/27)、O 3 群占 14.8% (4/27)、O 2 群占 14.8% (4/27)、O 11 群占 11.1% (3/27)、O 5 群占 7.4% (2/27)、O 1 群占 7.4% (2/27)、O 7 群占 3.7% (1/27)、O 9 群占 3.7% (1/27)、O 10 群占 3.7% (1/27)。27 株副溶血性弧菌的 *tdh* 与 *trh* 毒力基因均阴性。药敏试验结果显示,27 株副溶血性弧菌对青霉素类、-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、头孢类药物都有耐药株出现。结论 宁波市小水产品分离的副溶血性弧菌具有血清分群多样性,药敏结果多重耐药性的特点。

关键词:弧菌;副溶血性;血清分型;毒力;基因;抗药性;微生物

Serotype, Virulence and Drug Resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from Ningbo Small Aquatic Products

XU Fen-fen, XU Jing-ye, SONG Qi-fa, QIU Li-xiao, CHEN Mei-fen, JIN Xiao-xia
(Jiangbei District Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Ningbo 315020, China)

Abstract: Objective To understand the serotype distribution, toxin-producing characteristics and resistance to antibiotics of the *Vibrio parahaemolyticus* isolated from small aquatic products. **Method** Using the standard technique GB/T 4789.7—2003, 27 stains of *Vibrio parahaemolyticus* were isolated from small aquatic products collected from Ningbo market. Their serotypes were determined by PCR and virulence genes *tdh* and *trh* were also determined. Agar diffusion method was used to test the antibiotic susceptibility. **Results** 27 strains of *Vibrio parahaemolyticus* consisted of nine serum groups: O 4 33.3% (9/27), O 3 14.8% (4/27), O 2 14.8% (4/27), O 11 11.1% (3/27), O 5 7.4% (2/27), O 1 7.4% (2/27), O 7 3.7% (1/27), O 9 3.7% (1/27), O 10 3.7% (1/27). Neither *tdh* nor *trh* virulence gene was identified in any of the 27 strains. Susceptibility tests showed that some of the 27 strains were resistant to penicillins, -lactams, aminoglycosides, sulfonamides, quinolones and cephalosporins. **Conclusion** The *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the small aquatic products in Ningbo City have diversified characteristics of serological type and antibiotic susceptibility.

Key word: *Vibrio parahaemolyticus*; Serotyping; Virulence; Genes; Drug Resistance, Microbial

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vp*) 是一种嗜盐的革兰阴性致病菌,常存在于鱼、虾、贝壳类等海产品与小水产品中,在沿海地区是夏秋季腹泻的主要致病菌。长期来,宁波市的食物中毒中副溶血性弧菌一直占据病原的首位。为了解宁波市小水产品(包括淡水产品和海水产品,主要为牡蛎、毛蚶、蚶子、泥螺、花蛤、蛭子、虾、蟹等)中副溶血性弧菌污染状况,对部分宁波市小水产品中分离的副溶血性弧菌进行了血清分群、毒力基因检测及耐药性分析。

1 材料与方

1.1 菌株来源 27 株副溶血性弧菌菌株从宁波市

2005 - 2006 年部分菜市场销售的小水产品包括淡水产品和海水产品,主要有牡蛎、毛蚶、蚶子、泥螺、花蛤、蛭子、虾、蟹等(其中大部分为养殖产品),按 GB/T 4789.7—2003 方法分离所得。

副溶血性弧菌分群血清 11 种 O 群分群血清由日本生研所生产,批号:926076,在有效期内使用。

药敏纸片 杭州微生物试剂有限公司(批号:06.03.12)。

血清分群方法 严格按说明书操作步骤进行,取一定量细菌于生理盐水中,沸水浴煮沸 20 min,离心,弃去上清液,然后用生理盐水洗涤 3 次,离心 10 min(3 000 r/min),弃上清液,取菌体作血清凝集试验。

ERIC-PCR 基因分型 PCR 模板制备:将副溶

作者简介:徐奋奋 女 副主任技师

血性弧菌接种营养琼脂过夜培养,取菌落培养物悬浮于 TNE 缓冲液(10 mmol/L Tris, 20 mmol/L NaCl, 50 mmol/L EDTA, pH 7.5),加入终浓度为 0.5% SDS 和 100 μg/ml proteinase K, 55 °C 30 min, 酚 + 氯仿 + 异戊醇(25 + 24 + 1)抽提 DNA, 异丙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 用 TE buffer (10 mmol/L Tris - HCl, 1 mmol/L EDTA [pH 8])溶解。

ERIC-PCR 分型 采用 Versalovic J 等报道的方法^[4]。引物为 5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C - 3 和 5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G - 3 (上海塞百盛生物工程公司合成)。反应体系为: 50 μl 总体积, 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺ 2.5 mmol/L) 5 μl, 引物各 40 pmol, dNTP 各 10 μmol, Taq 酶 2.5 单位, 模版 1 μl。反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 90 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 60 s, 70 °C 延伸 5 min, 共 30 个循环, 最后 70 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

PCR 扩增 *tdh* 和 *trh* 毒力基因 *tdh* 引物为 sense: 5' - CGG TTC TGA TGA GAT ATT GT - 3 和 antisense: 5' - TCT GGA GGT TCA TCC AAA TA - 3, 根据 GenBank Access No. D90238 设计。*trh* 引物为 sense: 5' - TCA GTA TCT AAA TCA TTC GC 和 antisense: 5' - CAT AAC AAA CAT ATG CCC AT, 根据 GenBank Access No. AB112353.1 设计。反应体系为: 50 μl 总体积, 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺ 2.5 mmol/L) 5 μl, 引物各 40 pmol, dNTP 各 10 μmol, Taq 酶 2.5 单位, 模版 1 μl。反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。

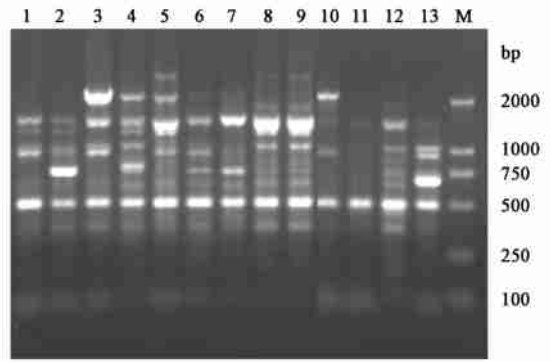
药敏试验 采用 WHO 推荐的改良 K - B 法。药敏试验的质控方法和结果判定依据为美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)微生物药物敏感试验执行标准, 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

2 结果

2.1 血清群分布 27 株副溶血性弧菌经血清凝集、PCR 分型, 结果共分出 9 个血清群, 分别为 O 4 群占 33.3% (9/27)、O 3 群占 14.8% (4/27)、O 2 群占 14.8% (4/27)、O 11 群占 11.1% (3/27)、O 5 群占 7.4% (2/27)、O 1 群占 7.4% (2/27)、O 7 群占 3.7% (1/27)、O 9 群占 3.7% (1/27)、O 10 群占 3.7% (1/27)。

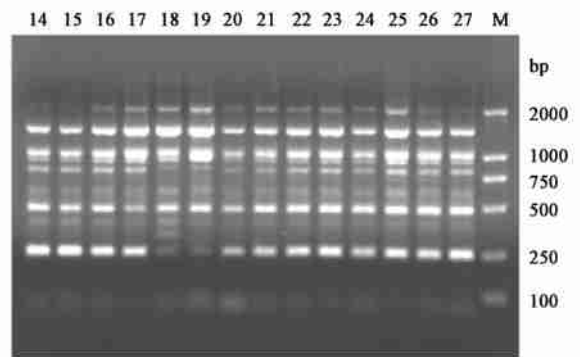
PCR 分型结果见图 1 和图 2, 根据扩增条带的多态性, 共分 15 个基因型, 其中 1 号为 1 型, 2 号为 2 型, 3 号为 3 型, 4 号为 4 型, 5 号为 5 型, 6 号为 6 型, 7 号为 7 型, 8~9 号为 8 型, 10 号为 9 型, 11 号为 10 型, 12 号为 11 型, 13 号为 12 型, 14~17 号为 13

型, 18~19 号为 14 型, 20~27 号为 15 型。



1~13 号为检测菌株编号; M 为 DNA Marker

图 1 ERIC-PCR 基因分型



14~27 号为检测菌株编号; M 为 DNA Marker

图 2 ERIC-PCR 基因分型

2.2 毒力基因检测结果 从小水产品中分离的 27 株副溶血性弧菌菌株经 PCR 方法检测, 毒力基因 *tdh*、*trh* 结果均阴性。

2.3 药敏试验 对 27 株副溶血性弧菌进行了 7 类 14 种的药敏试验, 检测结果显示, 27 株副溶血性弧菌对青霉素类、- 内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、头孢类药物都有耐药株, 具体见表 1。

表 1 27 株副溶血性弧菌菌株药敏试验结果

抗生素名称	药敏试验菌株数			耐药菌株比率 (%)
	R	I	S	
氨苄西林 (AMP)	18	2	7	66.7
阿莫西林 (AMX)	11	7	9	40.7
庆大霉素 (GEN)	10	3	14	37.0
链霉素 (STR)	20	2	5	74.1
四环素 (TCY)	2	1	24	7.4
环丙沙星 (CIP)	1	3	23	3.7
复方新诺明 (SXT)	0	0	27	0.0
甲氧苄啶 (TMP)	0	6	21	0.0
氯霉素 (CHL)	0	0	27	0.0
萘啶酮酸 (NAL)	2	4	21	7.4
磺胺嘧啶 (SSS)	1	0	26	3.7
头孢曲松 (CRO)	0	2	25	0.0
阿米卡星 (AMIC)	10	2	15	37.0
头孢噻吩 (CEP)	8	8	11	29.6

注: R: 耐药, I: 中介, S: 敏感。

论著

RP-HPLC 法测定冬虫夏草发酵液冻干粉中虫草素和腺苷含量

王海霞 胡高升 蒙 娅 贾景明
(沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 有效地控制冬虫夏草发酵液冻干粉的质量。方法 建立了测定虫草素和腺苷含量的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)。色谱条件:C₁₈柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈+水+甲醇(2+85+2);流速为1.0 ml/min;紫外检测波长260 nm。结果 虫草素浓度在0.45~18.00 μg/ml范围内与峰面积呈线性相关, $r=0.9993$, 平均回收率为96.5%, RSD 为2.3%。腺苷浓度在1.76~17.60 μg/ml范围内与峰面积呈线性相关, $r=0.9990$, 平均回收率为97.3%, RSD 为1.0%。结论 该方法样品处理简便, 结果可靠, 重现性好, 可有效地控制冬虫夏草发酵液冻干粉的质量。

关键词:色谱法, 高压液相;冬虫夏草属;虫草素;腺苷;植物提取物

Determination of Cordycepin and Adenosine in Freezer-dried Powder of Fermented *Cordyceps Sinensis* by RP-HPLC

WANG Hai-xia, Hu Gao-sheng, Meng Ya, JIA Jing-ming

(Shenyang Pharmaceutical University, Liaoning Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To control the quality of freezer-dried powder of fermented *C. sinensis*, cordycepin and adenosine were determined by RP-HPLC. **Method** RP-HPLC condition: C₁₈ column (250 mm ×4.6 mm, 5 μm); acetonitrile + water +

3 讨论

本实验27株副溶血性弧菌菌株来自宁波部分菜市场销售的小水产品, 包括淡水产品和海水产品, 主要有牡蛎、毛蚶、蚶子、泥螺、花蛤、蛏子、虾、蟹等, 大部分为养殖产品。经副溶血性弧菌13种O血清分群, 共有9个血清群, 分别为O4群、O3群、O2群、O11群、O5群、O1群、O7群、O9群、O10群。说明宁波市市售小水产品中携带的副溶血性弧菌血清群的多样性, 提示有小水产品引起各种感染的潜在性, 对其属性的认识, 有利于预防和控制此类疾病的发生。

27株副溶血性弧菌 *tdh* 和 *trh* 均阴性。有文章报道, 所有分离自环境的副溶血性弧菌菌株未见携带 *tdh*。小水产品中携带的副溶血性弧菌毒力与腹泻的关系有待进一步研究。

药敏试验结果表明, 小水产品中分离的副溶血性弧菌对复方新诺明和氯霉素100%敏感, 对青霉素类、-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、喹诺酮类、头孢类药物都有耐药株, 结果提示副溶血性弧菌也

可能存在超级耐药株。目前, 我国的水产养殖业中广泛使用抗生素, 若不加控制, 将会造成严重后果。

参考文献

- [1] 李孝权, 邓志爱, 柴巧学, 等. 副溶血性弧菌食源性疾病分离株的多态性分析[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(增刊): 57-58.
- [2] 张蔚, 孟冬梅, 潘劲草, 等. 杭州地区临床和环境分离副溶血性弧菌菌株携带毒力基因的特征[J]. 中华预防医学杂志, 2004, 38(3): 200-203.
- [3] 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.
- [4] HIN-CHUNG WONG. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from patients involved in food poisoning outbreaks in Taiwan by random amplified polymorphic DNA analysis [J]. J Clin Microbiol, 2001, 34: 1809-1812.
- [5] LU PL, CHANG, PAN HJ, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis to the investigation of a nosocomial outbreak of *Vibrio Parahaemolyticus* [J]. Microbiol Immunol Infect, 2000, 33(1): 29-33.
- [6] CLSI/NCCLS document M 100-S15. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [S].

[收稿日期: 2007-01-19]

中图分类号: R15; S944.3; R378.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2007)04-0307-03

作者简介: 王海霞 女 硕士生

通讯作者: 贾景明 男 副教授 博士