

力,促进 VP 耐药性的出现,因此在使用抗生素时,应充分考虑本地区致病菌的特异性耐药谱,提高合理用药的意识,控制多重耐药菌株的出现。

参考文献

- [1] 马聪,朱海明,严纪文,等.不同来源的副溶血性弧菌定性定量分析及毒素基因检测[J].中国食品卫生杂志,2009,21(5):402-405.
- [2] 严纪文,马聪,朱海明,等.2003—2005年广东省水产品中副溶血性弧菌的主动监测及其基因指纹图谱库的建立[J].中国卫生检验杂志,2006,16(4):387-391.
- [3] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.GB 4789.7—2013 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [4] NCCLS.美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准与指南(2010版)[S].2010.
- [5] Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analysis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2):578-585.
- [6] Arakawa E, Murase T, Shimada T, et al. Emergence and prevalence of a novel *Vibrio parahaemolyticus*, O3:K6 in Japan [J]. Jpn J Infect Dis, 1999, 52(6):246-247.
- [7] Chowdhury N R, Stine O C, Morris J G, et al. Assessment of evolution of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by multilocus sequencing typing [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3):1280-1282.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters Pacific Northwest, 1997 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 1998, 47(22):457-462.
- [9] Mario R, CaPeechi A. Altering the genome by homologous recombination [J]. Science, 1989(244):1288-1292.
- [10] Roque A, Molina A, Bolan C, et al. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2001, 17(9):383-387.
- [11] Feifei H, Robert D, Marlene E, et al. Antimicrobial Susceptibilities of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* isolates from Louisiana Gulf and retail raw oysters [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21):7096-7098.

论著

进口水产品中副溶血性弧菌耐药性和毒力基因的调查

于纪棉¹,倪晶晶¹,陶冬英¹,劳华均²,王建峰²,王春²

(1. 宁波卫生职业技术学院,浙江 宁波 315100; 2. 宁波出入境检验检疫局,浙江 宁波 315012)

摘要:目的 了解宁波口岸进口水产品中副溶血性弧菌的耐药性和毒力基因分布情况。方法 将分离自宁波口岸进口水产品中的 129 株副溶血性弧菌作为研究对象,利用 K-B 纸片扩散法测定细菌对 15 种抗生素的耐药性,使用 PCR 方法检测副溶血性弧菌的 4 个毒力基因(*tdh*、*tlh*、*trh*、*toxR*)。结果 菌株对氨苄西林、羧苄西林、头孢拉定的耐药率分别为 90.70%、98.45% 和 51.17%;对卡那霉素、头孢氨苄、头孢唑啉、头孢呋辛的耐药率分别为 1.55%、13.18%、2.33%、20.16%,中敏感率分别为 33.33%、52.71%、46.51%、40.31%;其他 8 种抗生素(四环素、强力霉素、阿米卡星、庆大霉素、头孢哌酮、氧氟沙星、氯霉素、复方新诺明)则比较敏感;毒力基因 *trh*、*tdh*、*tlh* 和 *toxR* 的携带率分别为 0%、0.78%、100% 和 100%。结论 强力霉素、庆大霉素、复方新诺明是治疗由进口水产品引起的副溶血性弧菌感染的首选抗生素;进口水产品中副溶血性弧菌的主要致病毒力基因携带率比较低。

关键词:副溶血性弧菌;耐药;毒力基因;食源性致病菌;抗生素;水产品;药敏试验

中图分类号:R155.5⁺5 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)04-0320-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.04.004

Survey of drug resistance and virulence gene of *Vibrio parahaemolyticus* from imported aquatic products

YU Ji-mian, NI Jing-jing, TAO Dong-ying, LAO Hua-jun, WANG Jian-feng, WANG Chun

(Ningbo College of Health Sciences, Zhejiang Ningbo 315100, China)

Abstract: Objective To survey the drug resistance and the distribution of virulence gene in isolated *Vibrio parahaemolyticus* (VP) from the imported aquatic products at Ningbo port. **Methods** The 129 VP strains were isolated

收稿日期:2014-5-27

基金项目:宁波市自然科学基金(2012A610180);宁波卫生职业技术学院自然科学基金(201101)

作者简介:于纪棉 女 讲师 研究方向为病理学和分子生物学 E-mail:yujimian@163.com

通讯作者:王春 男 高级工程师 研究方向为微生物检验 E-mail:wangchun@nbciq.gov.cn

from imported aquatic products at Ningbo port and 15 antibiotics were used for drug resistance test by K-B test method. Polymerase chain reaction was used for testing the 4 virulence genes (*tlh*, *trh*, *tdh*, *toxR*) from VP. **Results** The drug resistance rates of ampicillin, carbenicillin and cefradine were 90.70%, 98.45% and 51.17%, respectively. The drug resistance rates of kanamycin, cefalexin, cephalosporin and cefuroxime were 1.55%, 13.18%, 2.33% and 20.16%, respectively. Medium sensitive rates of kanamycin, cefalexin, cephalosporin and cefuroxime were 33.33%, 52.71%, 46.51%, 40.31%, respectively. All strains were sensitive to the 8 antibiotics (Tetracycline, doxycycline, amikacin, gentamicin, cefoperazone, ofloxacin, chloramphenicol, co-trimoxazole). The detection rates of *trh*, *tdh*, *tlh* and *toxR* genes were 0%, 0.78%, 100% and 100%, respectively. **Conclusion** The doxycycline, gentamicin, co-trimoxazole were the preferred antibiotic for people infected by VP from the imported aquatic products. The rate of VP strains carrying main virulence gene was relatively low in VP strains in the imported aquatic products.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; drug resistance; virulence genes; foodborne pathogenic bacteria; antibiotics; aquatic product; drug sensitivity test

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是革兰氏阴性菌,属于弧菌科,弧菌属,嗜盐,不耐酸,不耐热,广泛分布于海水、海底泥沙、浮游生物和鱼、虾、贝类等海产品中^[1]。每年都有人因食用被副溶血性弧菌污染的海产品而发生食物中毒,是引起食物中毒的主要病原菌之一^[2-3]。目前未见对进口水产品中分离的副溶血性弧菌的耐药性和毒力基因携带情况进行全面检测的相关报道。因此本研究对宁波地区进口水产品中的分离株进行耐药调查和毒力基因检测,以了解进口水产品中副溶血性弧菌的耐药情况和毒力基因分布特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

129株副溶血性弧菌分离自宁波地区进口水产品(见表1),由宁波出入境检验检疫局技术中心微生物实验室提供,经过 VITEK2 Compact 全自动微生物鉴定和药敏分析系统鉴定均为副溶血性弧菌。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922 购自美国 MBL。

表1 129株副溶血性弧菌来源

Table 1 Origin of 129 *Vibrio parahaemolyticus* strains

分离地区	菌株数	分离地区	菌株数	分离地区	菌株数
印度	19	印度尼西亚	5	美国	4
越南	10	太平洋群岛	20	厄瓜多尔	2
缅甸	17	马来西亚	3	贝宁	11
格陵兰	6	泰国	9	墨西哥	4
日本	1	斐济	4		
秘鲁	12	巴布亚新几内亚	2		

1.1.2 主要试剂与仪器

药敏纸片:卡那霉素(30 μg/片)、四环素(30 μg/片)、强力霉素(30 μg/片)、阿米卡星(30 μg/片)、庆大霉素(10 μg/片)、头孢哌酮(75 μg/片)、羧苄西林(100 μg/片)、氧氟沙星(5 μg/片)、氯霉素(30 μg/片)、头孢氨苄(30 μg/片)、头孢拉定(30 μg/片)、复方新诺明(1.25 μg/片)、

头孢唑啉(30 μg/片)、氨苄西林(10 μg/片)、头孢呋辛(30 μg/片),及 MH 琼脂培养基均购自杭州微生物试剂有限公司;Premix Taq D331A 试剂(大连 TaKaRa);细菌 DNA 提取试剂盒 D3350(美国 OMEGA);血平板(上海嘉和生物技术公司);NC2000C 微量分光光度计(美国基因);Gel Doc™ EZ 凝胶成像系统,S1000 型梯度 PCR 仪(美国 Bio-Rad)。

1.1.3 引物合成

tdh、*tlh*、*trh* 的引物参考文献[4],*toxR* 的引物参考文献[5]。4对毒力基因引物序列(见表2)由上海英俊公司合成。

表2 副溶血性弧菌毒力基因引物

Table 2 Primers for the virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*

基因	引物	引物序列	片段大小/bp
<i>tdh</i>	<i>tdh</i> -F	5'-GTAAAGGTCTCTGACTTTGGAC-3'	270
	<i>tdh</i> -R	5'-TGGAATAGAACCTTCATCTTACC-3'	
<i>tlh</i>	<i>tlh</i> -F	5'-AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG-3'	450
	<i>tlh</i> -R	5'-GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC-3'	
<i>trh</i>	<i>trh</i> -F	5'-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3'	500
	<i>trh</i> -R	5'-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3'	
<i>toxR</i>	<i>toxR</i> -F	5'-GTCTTCTGACGCAATCGTTG-3'	367
	<i>toxR</i> -R	5'-ATACGAGTGTTGCTGTCTCATG-3'	

1.2 方法

1.2.1 药敏试验

采用 CLSI 标准《抗菌药物敏感性试验执行标准》(纸片法)进行测定,药敏质控方法和结果判定按美国临床和实验室标准化研究所(CLSI/NCCLS)2012 版抗菌药物敏感性试验标准执行。

1.2.2 毒力基因检测

刮取血平板上副溶血性弧菌落,按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书的步骤进行副溶血性弧菌 DNA 提取,以提取的 DNA 为模版,按照 Premix Taq 试剂说明书进行 PCR 扩增。配制反应混合液总体积 25 μl,包括 Premix Taq 预混液 12.5 μl、上下引物各

0.5 μl (10 μmol/L)、模板 2 μl, 其余用水补足。tdh、ilh、trh 的反应条件: 预变性 94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 58 °C、45 s, 72 °C、60 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。toxR 的反应条件: 预变性 94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 60 °C、30 s, 72 °C、60 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 5 μl, 在 1.5% 的琼脂糖中进行电泳, 经 GelRed 染色后, 在凝胶成像系统中观察结果。

2 结果

2.1 药敏试验结果

对分离得到的 129 株副溶血性弧菌进行了 15 种抗生素的药敏试验, 结果显示 129 株副溶血性弧菌对氨苄西林、羧苄西林的耐药率分别为 90.70% 和 98.45%; 对头孢拉定的耐药率为 51.17%; 对卡那霉素、头孢氨苄、头孢唑啉、头孢呋辛的耐药率分别为 1.55%、13.18%、2.33%、20.16%, 中敏感率分别为 33.33%、52.71%、46.51%、40.31%; 对四环素、强力霉素、阿米卡星、庆大霉素、头孢哌酮、氧氟沙星、氯霉素、复方新诺明的敏感率分别为 96.12%、100%、97.67%、100%、96.12%、99.22%、98.45% 和 100%, 见表 3。

表 3 129 株副溶血性弧菌菌株耐药性试验结果

Table 3 Results of drug resistance of 129 *Vibrio*

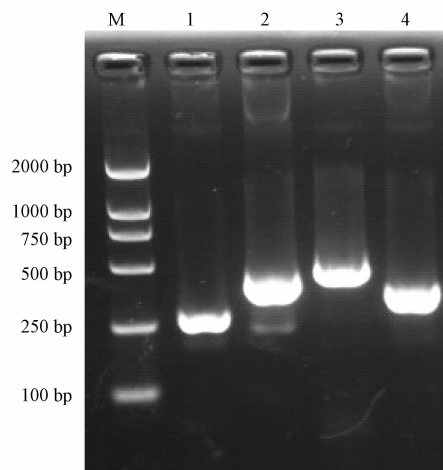
parahaemolyticus strains

抗生素	菌株数			敏感率 /%	中介敏 感率/%	耐药率 /%
	S	M	R			
卡那霉素	84	43	2	65.12	33.33	1.55
四环素	124	4	1	96.12	3.10	0.78
强力霉素	129	0	0	100.00	0.00	0.00
阿米卡星	126	3	0	97.67	2.33	0.00
庆大霉素	129	0	0	100.00	0.00	0.00
头孢哌酮	124	5	0	96.12	3.88	0.00
羧苄西林	2	0	127	1.55	0.00	98.45
氧氟沙星	128	1	0	99.22	0.78	0.00
氯霉素	127	2	0	98.45	1.55	0.00
头孢氨苄	44	68	17	34.11	52.71	13.18
头孢拉定	14	49	66	10.85	37.98	51.17
复方新诺明	129	0	0	100.00	0.00	0.00
头孢唑啉	66	60	3	51.17	46.51	2.32
氨苄西林	4	8	117	3.10	6.20	90.70
头孢呋辛	51	52	26	39.53	40.31	20.16

注: 表中 R 为耐药, M 为中介敏感, S 为敏感

2.2 毒力基因检测结果

对宁波地区进口水产品中副溶血性弧菌进行 PCR 检测, 同时携带 4 个毒力基因的菌株没有发现, 同时携带 tdh、ilh 和 toxR 的菌株 1 株, 同时携带 ilh 和 toxR 的菌株 128 株。ilh、toxR 的携带率为 100%, tdh 的携带率为 0.78%, trh 的携带率 0%。4 个毒力基因 PCR 产物与预测结果一致, 见图 1。



注: M 为 DL2000 Marker; 1. tdh 基因; 2. ilh 基因; 3. trh 基因; 4. toxR 基因

图 1 副溶血性弧菌 4 个毒力基因 PCR 产物图

Figure 1 PCR Results for the virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus*

3 讨论

3.1 进口水产品中副溶血性弧菌耐药性情况

副溶血性弧菌是重要的食源性致病菌之一, 对其开展耐药性分析具有重要意义, 国外研究^[6]显示副溶血性弧菌的多重耐药问题非常突出。129 株分离自宁波口岸进口水产品中副溶血性弧菌对 15 种抗生素的的耐药性试验结果显示: 对强力霉素、阿米卡星、庆大霉素、头孢哌酮、氧氟沙星、氯霉素、复方新诺明的耐药率为 0%, 因此上述抗生素对误食带有副溶血性弧菌的进口水产品所致感染可作为首选抗生素; 而羧苄西林、氨苄西林和头孢拉定的耐药率则分别达到 98.45%、90.70% 和 51.17%, 不适宜选用; 卡那霉素、头孢氨苄、头孢唑啉和头孢呋辛的中敏感性菌株数比例较高, 需要关注。

本试验得到菌株的耐药性与以往国内报道的文献不同。王秋亚等^[7]对 2009—2011 年 3 年内北京通州区分离的副溶血性弧菌耐药谱进行分析, 其中四环素的敏感率是 100%, 而本研究显示从进口水产品中分离到的副溶血性弧菌出现了四环素耐药菌株。江艳华^[8]对青岛市场上销售的贝类副溶血性弧菌进行耐药性分析, 卡那霉素的敏感率是 98%, 无耐药菌株, 而本试验中副溶血性弧菌对卡那霉素的敏感率为 65.12%, 且出现了耐药菌株。越来越多新的耐药菌株的出现和入境对我国的食品安全构成威胁。由于细菌的耐药性可以通过耐药质粒, 耐药整合子等在肠道不同菌株间互相传播, 使耐药细菌不断增加, 因此, 必须加强对进境水产品的监管, 及时掌握细菌的耐药状况, 为指导临床合理使用抗菌药物提供科学依据^[9]。

3.2 进出口水产品中副溶血性弧菌毒力基因分布特征

副溶血性弧菌源性的食品安全事故逐年增加^[10],但是,并不是所有的副溶血性弧菌都能致病,从海产品和环境中分离到的副溶血性弧菌菌株绝大多数是非致病菌株^[11]。据文献报道^[12]绝大多数的临床分离的致病株都携带 *tdh* 和 *trh* 两种基因中的一种或二者都有,这两个毒力基因具有致病性已经得到公认,即由 *tdh* 基因编码的耐热直接溶血素(TDH),和由 *trh* 基因编码的相关耐热溶血素(TRH)。对宁波地区进口的来自 16 个国家的水产品中分离的 129 株副溶血性弧菌进行了相关毒力基因的检测,结果显示 129 株副溶血性弧菌中 *tdh* 基因只检出了 1 株,*trh* 基因则未检出,其结果与胡婕和李薇薇等人对国内水产品中毒力基因调查结果基本一致^[13-14],这说明水产品中的菌株,毒力基因携带率地区差异不是太大。但临床病人中分离到的菌株中 *tdh* 基因检出比较高,同时也有检出 *trh* 基因^[15],与临床菌株相比,进口水产品中副溶血性弧菌携带有致病性的主要毒力基因(*tdh*、*trh*)菌株比较少。

副溶血性弧菌还携带一种不耐热的溶血素基因 *tlh*,位于染色体上,本身并不具备溶血活性,其在副溶血性弧菌中是否起到致病作用及其功能目前还不清楚^[16]。LIN 等^[17]发现副溶血性弧菌中还有一种类似霍乱 *toxRS* 操纵子的同源序列的毒力基因 *toxR*,在 *toxS* 存在情况下,*toxR* 能在转录水平上促进 *tdh* 基因的表达。本研究分离的副溶血性弧菌中 *tlh* 基因和 *toxR* 基因携带率为 100%,是否能致病尚不清楚,但由于其普遍存在临床、食品和环境中的菌株中,且检出率高,因此可以作为副溶血性弧菌检测鉴定使用^[13,18]。在进口水产品中应完善副溶血性弧菌检测方法,增加对毒力基因的检测,通过检出率和毒力基因携带率可以得出水产品中有毒株的比例,为今后开展风险评估提供基本数据。

参考文献

[1] 潘柳波,王舟,黄薇,等. 2006—2008 年深圳市食物中毒情况分析[J]. 中国公共卫生管理,2010,26(5):540-541.
 [2] 张勇,赖植发,周海涛,等. 副溶血性弧菌临床分离株血清型、毒力基因和 PFGE 分子分型特征分析[J]. 卫生研究,2013,42(4):619-624
 [3] 黄芳,邓瑛,曲梅,等. 2010 年北京市感染性腹泻病原学监测

分析[J]. 中华预防医学杂志,2011,45(9):820-824.
 [4] 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 *tlh*, *tdh* and *trh* [J]. J Microbiol Methods, 1999, 36(3):215-225.
 [5] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species level by PCR targeted to the *toxR* gene[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4):1173-1177.
 [6] JUN J W, Kim J H, Choresca C H, et al. Isolation, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* in Korean seafood [J]. Foodborne Pathog Dis, 2011, 9(3):224-231.
 [7] 王秋亚,朱联辉,张兰荣,等. 2009—2011 年北京通州区分离的副溶血性弧菌的耐药谱分析[J]. 生物技术通讯,2012,23(3):314-317.
 [8] 江艳华,姚琳,宋春丽,等. 青岛市售贝类副溶血性弧菌污染状况及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(2):375-377.
 [9] LIU M, WONG M H, CHEN S. Molecular characterisation of a multidrug resistance conjugative plasmid from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(6):575-579.
 [10] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992—2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网[J]. 卫生研究,2004,33(6):725-727.
 [11] Nishibuchi M, Kaper J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*; virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. Infection and Immunity, 1995, 63(6):2093-2099.
 [12] ZHANG X H, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 98(5):1011-1019.
 [13] 李薇薇,王晓英,郭云昌. 中国部分水产品副溶血性弧菌毒力基因的分布特征[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(3):239-243.
 [14] 胡婕,陈茂义,陈婷,等. 水产品及其环境中副溶血性弧菌污染状况与毒力基因分布研究[J]. 公共卫生与预防医学,2013,24(4):33-37.
 [15] 宋曼丹,严纪文,朱海明,等. 不同来源副溶血性弧菌分离株的耐药性和毒力分析[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(11):2785-2787.
 [16] Taniguchi S, Hirano H, Kubomura S, et al. Comparison of the nucleotide sequences of the genes for the thermostable direct hemolysin and the thermolabile hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiol pathogen, 1986, 1(5):425-432.
 [17] LIN Z, Kumagai K, Baba K, et al. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* *toxRS* operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene [J]. J Bacteriol, 1993, 175(12):3844-3855.
 [18] 陈茂义,胡婕,陈婷,等. 副溶血性弧菌毒力基因研究进展[J]. 公共卫生与预防医学,2013,24(3):65-67.