

- [15] XIONG Y W, WANG P, LAN R T, et al. A novel *Escherichia coli* O157: H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36144.
- [16] MENG Q, XIONG Y W, LAN R T, et al. SNP genotyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 isolates from China and genomic identity of the 1999 Xuzhou outbreak [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 16: 275-281.

- [17] 李睿, 戴诗皎, 戴锴, 等. 食品中非 O157 大肠杆菌志贺毒素基因序列分析. *食品科学*, 2010, 21(3): 236-238.
- [18] Orth D, Grif K, Khan A B, et al. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin in vitro correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(3): 235-242.

论著

2011—2013 年广州市海珠区不同来源副溶血性弧菌分离株血清分型及耐药性研究

吴琪¹, 伦嘉欣², 许少洪¹, 李映霞¹, 黄芳¹, 曾雅¹

(1. 广州市海珠区疾病预防控制中心, 广东 广州 510288; 2. 广东医学院公卫学院, 广东 东莞 523808)

摘要:目的 了解近年来广州市海珠区副溶血性弧菌食物中毒分离株、散发腹泻病人监测分离株、外环境分离株的血清分型及耐药现状。方法 2011—2013 年 61 株副溶血性弧菌, 包括 17 株食物中毒菌株、27 株散发腹泻病人菌株、17 株外环境监测菌株, 对其进行生化鉴定、血清分型及药敏试验。结果 17 株食物中毒分离菌株, 共分 6 个血清型, O3: K6 共 12 株 (70.6%); 27 株散发腹泻病人分离菌株, 共分 10 个血清型, O3: K6 共 17 株 (63.0%); 17 株外环境分离菌株, 共分 11 个血清型, 其血清型分布分散。61 株菌株出现两重耐药 3 株, 三重耐药 1 株。结论 广州市海珠区食物中毒、腹泻病人中主要流行的血清型是 O3: K6, 不同来源的分离株存在不同程度的抗生素耐药。

关键词: 副溶血性弧菌; 血清分型; 耐药; 食源性致病菌; 分型; 药敏试验

中图分类号: R155; R378 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)04-0317-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.04.003

Analysis of serotype and antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Haizhu District of Guangzhou during 2011-2013

WU Qi, LUN Jia-xin, XU Shao-hong, LI Ying-xia, HUANG Fang, ZENG Ya

(Haizhu Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Guangzhou 510288, China)

Abstract: Objective To study the current status of serotype and drug resistance in *Vibrio parahaemolyticus* in food poisoning, diarrhea patients and the environment in Haizhu district of Guangzhou. **Methods** 17 strains from food poisoning, 27 strains from sporadic diarrhea patients and 17 strains from the environment were identified with biochemical and serotyping tests. Antibiotic resistance test of the isolates was further performed. **Results** Seventeen strains from food poisoning could be divided into 6 serotypes, and the prevalent serotype was O3: K6 (12/17, 70.6%). Twenty-seven strains from diarrhea patients could be divided into 10 serotypes, and the prevalent serotype was O3: K6 (17/27, 63.0%). Seventeen strains from the environment could be divided into 11 serotypes, but the serotypes were scattered. In addition, there were three dual-resistant strains, and one triple-resistant strain in those 61 strains. **Conclusion** The strains were on different levels of antibiotic resistance, and the prevalent serotype was O3: K6 in Haizhu district of Guangzhou.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; serotype; antibiotics resistance; foodborne pathogen; typing; drug sensitivity test

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是

革兰氏阴性嗜盐细菌, 属于弧菌科弧菌属。1996 年后在世界范围内出现了 O3: K6 新血清型的流行, 形成了所谓的 O3: K6 大流行克隆, 并以其高感染力和蔓延能力受到世界各国的关注。该菌首先在印度加尔各答、中国台湾、日本等地流行, 随后蔓延到世界多数沿海国家包括美国、智利等。我国食源性疾

收稿日期: 2014-05-28

基金项目: 广州市海珠区 2013 年医疗卫生指导性科技计划项目 (海科信 [2013] 37 号-3)

作者简介: 吴琪 女 检验技师 研究方向为微生物检验

E-mail: earhill@163.com

病监测网及国家食品安全信息监测系统统计数据显示:2002—2007年暴发的细菌性食物中毒事件中,副溶血性弧菌位居病原菌之首^[1]。随着抗生素的普遍应用,副溶血性弧菌出现了不同的抗生素耐药类别,如氨基糖苷类、 β -内酰胺类和喹诺酮类,甚至多重耐药^[2]。本研究收集了2011—2013年,来自海珠区食物中毒分离的副溶血性弧菌17株、458例散发腹泻病人中分离的副溶血性弧菌27株、139份外环境监测(包括鱼类、虾类、贝类、珠江水)分离的副溶血性弧菌17株,进行血清分型和药敏试验,了解副溶血性弧菌的血清型分布及O3:K6大流行克隆的存在状况,分析不同来源副溶血性弧菌分离株间的耐药谱差异。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

61株VP分离株均来自广州市海珠区疾病预防控制中心菌种保存库,其中17株为食物中毒病人的肛拭、粪便及食品样品分离株;28株为散发腹泻病人肛拭、粪便分离株;16株为139份外环境样品的分离株。所有样品在2011—2013年收集完成。

1.1.2 试剂

MH琼脂和TCBS琼脂(广东环凯微生物科技有限公司),弧菌显色培养基(法国CHROMagar),细菌微量生化管(杭州天和微生物试剂有限公司),副溶血性弧菌诊断血清、纸片药敏试纸均购自天津生物芯片技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生化试验

生化鉴定按照GB/T 4789.7—2013《食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[3]进行。

1.2.2 血清分型

O抗原检测:取菌苔与3% NaCl溶液混匀制成菌悬液,121℃灭菌1h,以破坏K抗原,灭菌后4000 r/min离心2min,弃上清液,加1滴5%甘油,混合均匀后与O抗原血清凝集,用3% NaCl作自凝对照。

K抗原检测:直接取菌苔与K抗原血清凝集,用3% NaCl作自凝对照。

1.2.3 药敏试验

根据美国临床标准委员会(NCCLS)推荐的K-B琼脂法进行,使用抗生素包括:链霉素(10 μ g),庆大霉素(10 μ g),氯霉素(30 μ g),环丙沙星(5 μ g),复方新诺明(27.5 μ g),四环素(30 μ g),氨苄西林(10 μ g),头孢噻肟(30 μ g),头孢他啶(30 μ g)。药敏结果按照《美国临床实验室标准化委员会标准与

指南》^[4]标准判定。

2 结果

2.1 生化结果

特异性生化尿素酶阳性4株:其中3株来源于散发腹泻病人,血清型为O1:KUT(2株)和O1:K56(1株);1株来源于外环境监测,血清型O1:KUT。其余生化符合副溶血性弧菌特征。

2.2 菌株血清分型结果

在2011—2013年收集的61株VP菌株中,完全分型45株,分型率73.8%。共分出8个O群20个血清型。其中17株食物中毒分离菌株,完全分型16株,分型率94.1%,共分6个血清型,以O3:K6为主(占70.6%);27株散发腹泻病人分离菌株,完全分型23株,分型率85.2%,共分10个血清型,以O3:K6为主(占63.0%);17株外环境分离菌株,完全分型7株,分型率41.2%,共分11个血清型,其血清型散在分布。有8个血清型在散发腹泻病例和外环境监测中被同时分离到。血清分型详见表1。

表1 2011—2013年海珠区不同来源副溶血性弧菌
主要血清型分布

Table 1 Serotype in *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Haizhu District during 2011-2013

血清型		食物中毒 散发腹泻病例 外环境监测			合计 (分型占 比/%)
		菌株数 (分型占 比/%)	菌株数 (分型占 比/%)	菌株数 (分型占 比/%)	
O1	KUT	—	2(7.4)	2(11.8)	4(6.6)
	K56	—	1(3.7)	—	1(1.6)
O2	KUT	—	—	3(17.6)	3(4.9)
	K3	—	—	1(5.9)	1(1.6)
O3	K28	—	—	1(5.9)	1(1.6)
	K6	12(70.6)	17(63.0)	1(5.9)	30(49.2)
O4	KUT	—	1(3.7)	2(11.8)	3(4.9)
	K6	1(5.9)	1(3.7)	—	2(3.3)
	K12	—	1(3.7)	—	1(1.6)
O5	K41	—	1(3.7)	—	1(1.6)
	K17	—	1(3.7)	1(5.9)	2(3.3)
	KUT	—	—	2(11.8)	2(3.3)
O6	K9	—	—	1(5.9)	1(1.6)
	K12	1(5.9)	—	—	1(1.6)
	K21	—	1(3.7)	—	1(1.6)
O8	K24	1(5.9)	—	—	1(1.6)
	KUT	—	1(3.7)	2(11.8)	3(4.9)
O10	KUT	1(5.9)	—	—	1(1.6)
	K1	1(5.9)	—	—	1(1.6)
	K9	—	—	1(5.9)	1(1.6)
合计		17(100)	27(100)	17(100)	61(100)

注:KUT为K抗原未分型;—为未检出

2.3 药敏试验结果

2.3.1 不同来源副溶血性弧菌药敏试验情况

17株食物中毒分离株存在1种耐药谱:氨苄西

林耐药(15株,耐药率为88.2%);27株散发腹泻病分离株存在3种耐药谱:氨苄西林耐药(21株,耐药率为77.8%),氨苄西林-链霉素耐药(1株,耐药率为3.7%),氨苄西林-环丙沙星耐药(1株,耐药率为3.7%);17株外环境分离株存在3种耐药谱:氨苄

西林耐药(16株,耐药率为94.1%),氨苄西林-庆大霉素耐药(1株,耐药率为5.9%),氨苄西林-链霉素-复方新诺明耐药(1株,耐药率为5.9%),对其他抗生素均敏感或中介敏感,对环丙沙星的中介敏感高达47.1%。详见表2。

表2 2011—2013年海珠区不同来源副溶血性弧菌药敏试验情况(%)

Table 2 Antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Haizhu District during 2011-2013

药物谱	抗菌药物	食物中毒分离株			散发腹泻病分离株			外环境分离株		
		敏感率	中敏率	耐药率	敏感率	中敏率	耐药率	敏感率	中敏率	耐药率
青霉素类	氨苄西林	11.8(2/17)	0.0(0/17)	88.2(15/17)	7.4(2/27)	14.8(4/27)	77.8(21/27)	0.0(0/17)	5.9(1/17)	94.1(16/17)
头孢菌素类	头孢他定	100.0(17/17)	0.0(0/17)	0.0(0/17)	100.0(27/27)	0.0(0/27)	0.0(0/27)	100.0(17/17)	0.0(0/17)	0.0(0/17)
	头孢噻肟	100.0(17/17)	0.0(0/17)	0.0(0/17)	88.9(24/27)	7.4(2/27)	0.0(0/27)	82.4(14/17)	17.6(3/17)	0.0(0/17)
氨基糖苷类	链霉素	94.1(16/17)	5.9(1/17)	0.0(0/17)	92.6(25/27)	3.7(1/27)	3.7(1/27)	76.5(13/17)	17.6(3/17)	5.9(1/17)
	庆大霉素	82.4(14/17)	17.6(3/17)	0.0(0/17)	100.0(27/27)	0.0(0/27)	0.0(0/27)	94.1(16/17)	0.0(0/17)	5.9(1/17)
四环素类	四环素	94.1(16/17)	5.9(1/17)	0.0(0/17)	100.0(27/27)	0.0(0/27)	0.0(0/27)	94.1(16/17)	5.9(1/17)	0.0(0/17)
氯霉素类	氯霉素	100.0(17/17)	0.0(0/17)	0.0(0/17)	100.0(27/27)	0.0(0/27)	0.0(0/27)	100.0(17/17)	0.0(0/17)	0.0(0/17)
磺胺类	复方新诺明	94.1(16/17)	5.9(1/17)	0.0(0/17)	100.0(27/27)	0.0(0/27)	0.0(0/27)	94.1(16/17)	0.0(0/17)	5.9(1/17)
喹诺酮类	环丙沙星	88.2(15/17)	11.8(2/17)	0.0(0/17)	88.9(24/27)	7.4(2/27)	3.7(1/27)	52.9(9/17)	47.1(8/17)	0.0(0/17)

2.3.2 VP菌株多重耐药情况

61株样品分离株中单纯耐氨苄西林1种药物的有52株(85.2%),其中食物中毒15株,散发腹泻病例21株,外环境监测16株;具有耐2种药物的有3株(4.9%),其中散发腹泻病例2株,外环境监测1株;具有耐3种药物的有1株(1.6%),存在于外环境监测分离株中。详见表3。

表3 VP菌株多重耐药情况

Table 3 Multiple resistance in *Vibrio parahaemolyticus*

抗菌药物	耐药菌株数		
	食物中毒	腹泻病例	外环境
氨苄西林	15	21	16
氨苄西林-环丙沙星	0	1	0
氨苄西林-复方新诺明	0	1	0
氨苄西林-庆大霉素	0	0	1
氨苄西林-复方新诺明-链霉素	0	0	1

3 讨论

本研究分析了海珠区近3年61株不同来源副溶血性弧菌的血清型分布,共分离出8个O群20个血清型。有报道^[5]O3:K6流行克隆主要血清型包括O3:K6、O1:KUT、O1:K25、O1:K26、O4:K68等。本研究发现,在食物中毒和散发腹泻病分离株中,O3:K6为明显的优势血清型,分别占70.6%和63.0%。所检测出副溶血性弧菌两种血清型O3:K6和O1:KUT属于亚洲地区O3:K6流行克隆小生境^[6],而其他血清型的获得可能是副溶血性弧菌对宿主细胞免疫压力的选择反应^[7]。外环境菌株的血清型丰富且多变,共有8个O群10个血清型,其散在分布,O1、O2、O3、O4、O6、O8是常见血清群,其中发现1株O3:K6,2株O1:KUT,说明食物链中存在大流行株的可能性。另外至少有8种血清型同时从外环境和散发腹泻病例

中分离到,说明食物链中存在潜在危险因素,虽未造成食源性疾病爆发和流行,但同样值得关注。

尿素酶是许多致病性细菌的致病因子,而副溶血性弧菌一直被认为是尿素酶阴性的细菌,但来源于1997年美国西海岸地区的副溶血性弧菌中毒患者的某些临床株却具有尿素酶活性^[8]。后来研究发现,尿素酶可能是某些副溶血性弧菌的毒力因子之一,携带*trh*基因的分株几乎都具有尿素酶表型。同时,发现副溶血性弧菌的特有血清型与尿素酶基因型之间存在一定的相关性^[9],主要存在于O1:KUT血清型副溶血性弧菌中,本研究证实了这点,尿酶阳性菌株有4株,均为O1群,其中3株血清型为O1:KUT。而外环境中分离到的尿酶阳性菌株提示食物链中存在携带毒力基因菌株的风险。

随着抗生素的大量使用,副溶血性弧菌的耐药株不断增加,而不同地区有其独特的耐药谱。本研究发现本地区食物中毒分离株存在1种耐药谱:耐氨苄西林;散发腹泻病分离株存在3种耐药谱:耐氨苄西林、耐氨苄西林-链霉素、耐氨苄西林-环丙沙星;外环境分离株存在3种耐药谱:耐氨苄西林、耐氨苄西林-庆大霉素、耐氨苄西林-链霉素-复方新诺明。Roque等^[10]在国外的研究中发现VP对氨苄西林抗性达68%,Feifei等^[11]研究发现VP对氨苄西林抗性达81%,而本地区VP对氨苄西林耐药高达85.2%。值得注意的是在散发腹泻病人分离株和外环境分离株中,发现有多重耐药菌株产生,其耐药机制,主要与产生灭活酶或钝化酶、药物作用靶位改变、细胞膜渗透性改变、主动药物外排机制、耐药质粒介导耐药性等有关。食源性致病菌的耐药性对食品安全及人类健康的影响已经引起人们的重视。在食物链和临床中抗生素的大量使用,提供VP耐药性变异的选择性压

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