

调查研究

2017—2021年泉州市食品污染风险监测中副溶血性弧菌耐药性及分子分型研究

吴小凤¹, 庄春红², 陈韵妍¹, 郑友限¹

(1. 福建医科大学附属泉州市疾病预防控制中心, 福建泉州 362000; 2. 泉州医学高等专科学校, 福建泉州 362000)

摘要:目的 了解2017—2021年泉州地区食品污染风险监测中副溶血性弧菌的耐药情况以及菌株之间的同源性关系。方法 对各县区送检的食品样本进行副溶血性弧菌的增菌培养和分离鉴定, 荧光定量PCR法进行毒力基因(*tdh*, *trh*和*tlh*)检测, 微量肉汤稀释法进行药敏试验, 脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术进行分子分型, 利用BioNumerics 6.6软件进行聚类分析。结果 210份食品样本共检出副溶血性弧菌65份, 总检出率为30.95%; 毒力基因检测中*tlh*基因100%检出, *tdh*和*trh*均未检出; 药敏试验显示65株副溶血性弧菌对8种抗生素表现出不同程度的耐药, 其中耐药最强的是多黏菌素E(27.70%, 18/65), 而对美罗培南、环丙沙星、头孢他啶/阿维巴坦、替加环素、阿奇霉素、茶啉酸、链霉素、复方新诺明和阿米卡星9种抗生素不具有耐药性。65菌株通过PFGE图谱聚类分析显示63种型别, 菌株之间相似度为34.67%~100.0%。结论 泉州地区食品中存在一定程度的副溶血性弧菌污染, 所分离出的副溶血性弧菌对多种抗生素具有较高敏感性, 菌株分布呈多态性, 相互之间关系比较分散, 亲缘关系较远。

关键词:副溶血性弧菌; 毒力基因; 耐药性; 分子分型

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2023)09-1328-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2023.09.012

Drug resistance characteristics and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food contamination risk monitoring in Quanzhou City from 2017 to 2021

WU Xiaofeng¹, ZHUANG Chunhong², CHEN Yunyan¹, ZHENG Youxian¹

(1. Quanzhou Center for Disease Control and Prevention, Fujian Quanzhou 362000, China;

2. Quanzhou Medical College, Fujian Quanzhou 362000, China)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the molecular types and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from food contamination risk monitoring in Quanzhou City from 2017 to 2021. **Methods** *Vibrio parahaemolyticus* was isolated and identified in food samples from various counties. The virulence genes (*tdh*, *trh*, and *tlh*) were detected by fluorescence quantitative PCR and the micro broth dilution method was used for drug-resistance analysis. The molecular typing was analyzed using the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) method. Bionumerics 6.6 software was used to analyze the similarity between strains. **Results** A total of 65 *Vibrio parahaemolyticus* strains were isolated from 210 specimens. The drug susceptibility results showed that 65 strains of *Vibrio parahaemolyticus* showed eight kinds of drug resistance spectra. The resistance rate to polymyxin E was the highest (27.70%, 18/65). All the strains were not resistant to meropenem, ciprofloxacin, ceftazidime/avibactam, tigecycline, azithromycin, nalidixic acid, streptomycin, cotrimoxazole, and amikacin. The 65 strains were divided into 63 PFGE patterns. The similarity between each pattern was 34.67%~100%. **Conclusion** *Vibrio parahaemolyticus* exists in food in Quanzhou City. The isolated *Vibrio parahaemolyticus* have high sensitivity to a variety of antibiotics, the distribution of the strains is polymorphic, and the relationships between them were scattered and distant.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; virulence genes; drug resistance; molecular classification

收稿日期: 2022-08-08

基金项目: 泉州市科技计划项目课题(2020N067S); 福建省中青年教育科研项目(JAT201241)

作者简介: 吴小凤 女 主管技师 研究方向为病原菌检测 E-mail: wuxiaofeng1221@163.com

通信作者: 郑友限 男 副主任技师 研究方向为食源性疾病预防 E-mail: 870300059@qq.com

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种革兰氏阴性嗜盐性细菌,主要生存于近海水、海产品以及含盐分较高的腌制食品中,是引起我国沿海地区细菌性食物中毒危害的首要食源性致病菌之一^[1-2]。随着分子生物学技术的发展,副溶血性弧菌分子分型方法也越来越多,其中脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)技术因具有较好的重复性和分辨率,被誉为细菌分子分型的“金标准”^[3],已被广泛应用于细菌的分子流行病学研究中,通过同源性分析,能了解菌株之间的亲缘关系,从而确定传染源或传播途径^[4]。

福建省泉州市是我国重要的沿海城市之一,水产品的生产量和消费量逐年增多。研究表明,近年来由于水产养殖业及临床上抗生素的不规范使用导致副溶血性弧菌耐药性日益严重,其耐药菌通过食物链进入人体,造成常规抗生素失效,给临床治疗带来巨大挑战,严重威胁人类健康^[5]。本文分析近5年来食品中副溶血性弧菌分离株的耐药情况和同源性关系,可为副溶血性弧菌的风险防控提供重要的依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

65株副溶血性弧菌分离自泉州各县区(市)的农贸市场、超市水产品及其制品,药敏试验标准菌株大肠埃希菌(ATCC 25922)购自中国药品生物制品检定所,PFGE试验标准菌株沙门菌H9812来源于福建省疾病预防控制中心;3.5%氯化钠碱性蛋白胨水(北京陆桥公司);弧菌显色培养基(法国科玛嘉公司);革兰阴性细菌鉴定卡(法国梅里埃公司);革兰阴性需氧菌药敏检测试剂板(上海星佰公司);副溶血性弧菌*tlh*、*tdh*、*trh*基因实时荧光定量PCR检测试剂盒(深圳生科原公司);Seakem Gold琼脂糖(美国LONZA公司);蛋白酶K(德国Merck公司);限制性内切酶Not I(美国NEB公司);5xTBE缓冲液(索莱宝公司),GelRed染剂(美国Biotium公司),以上培养基和试剂均在有效期内使用。

法国梅里埃VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定仪;上海复星Droplet48全自动微生物药敏分析仪;美国ABI 7500实时荧光定量PCR仪;美国BioCHEF Mapper脉冲场凝胶电泳仪;美国Bio GelDoc XR+凝胶成像系统。

1.2 菌株分离鉴定

对各县区采集的210份水产品,依照GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检

验 副溶血性弧菌检验》操作进行副溶血性弧菌的增菌与分离,挑取可疑菌落用全自动细菌鉴定仪进行生化鉴定。

1.3 毒力基因检测

副溶血性弧菌毒力基因的检测依照荧光定量PCR检测试剂盒说明书,经DNA核酸提取后于ABI 7500 PCR仪上进行定性检测和分析^[6]。

1.4 药敏试验

根据《2020年国家致病菌识别网技术手册》,参照美国临床实验室标准化协会研究所(CLSI)推荐的微量肉汤稀释法,将菌液稀释后加样到革兰阴性需氧菌药敏盘,放入全自动微生物药敏分析仪中进行上样、孵育和检测,根据观察到的多个生长特征参数计算卡片上所含每种抗菌药物的最小抑菌浓度(Minimal inhibitory concentration, MIC)数值。根据鉴别性分析制订算法,确定敏感性判读,结果分为敏感(S)、中介(I)和耐药(R)3种。试验质控标准菌株为大肠埃希菌(ATCC 25922),试验标准菌株为副溶血性弧菌(ATCC 17802)。

1.5 PFGE分型

按照国家病原菌分子分型监测网络PulseNet China规定的副溶血弧菌PFGE标准方法进行,选取沙门氏菌标准株H9812作为标准分子量,主要步骤和电泳参数如下:限制性内切酶Not I(40 U/胶块)37℃酶切2 h,电泳条件为转换时间10~35 s,分子量78~396 kb,电泳温度14℃,电泳时间19 h,电泳结束后GelRed染色30 min,凝胶成像仪中拍照获得电泳图谱^[7]。

1.6 数据分析

将获得的PFGE图谱导入BioNumerics 6.6软件,选定非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析,并以相似系数(F值)来衡量不同菌株的相似度,从而确定菌株之间的亲缘关系。条带完全一样,说明为相同菌株;条带存在1~3条差异,说明菌株间有相近关系;存在4~6条差异,说明菌株可能有相近关系;存在6条或更多以上差异,菌株之间视为无相关性。

2 结果

2.1 菌株分离鉴定

2017—2021年共采集泉州地区各个县区(市)水产品及其制品共210份,经分离培养、生化鉴定,共分离出65株副溶血性弧菌,检出率为30.95%,从表1中看出不同样品类别检出率有差异,其中贝类检出率最高达42.86%,其次是甲壳类(虾类)产品检出率达35.71%。

表1 各类水产品及其制品中副溶血性弧菌检出率

样品类别	检测数/份	阳性数/份	检出率/%
鱼类	90	25	27.78
贝类	35	15	42.86
甲壳类(虾类)	42	15	35.71
头足类	15	4	26.67
即食生制动物性水产品	28	6	21.43
合计	210	65	30.95

2.2 菌株毒力基因携带情况

210份水产品中分离出的65株副溶血性弧菌,进行*tlh*、*tdh*、*trh*基因实时荧光定量PCR检测,结果显示,分离株携带*tlh*基因的检出率为100%,而*tdh*、*trh*基因均未检出。

表2 2017—2021年泉州市65株副溶血性弧菌耐药性分析

抗生素	菌株数/%			抗生素	菌株数/%		
	耐药R	中介I	敏感S		耐药R	中介I	敏感S
氨苄西林	14(21.54)	2(3.08)	49(75.38)	美罗培南	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
氯霉素	1(1.54)	2(3.08)	62(95.38)	环丙沙星	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
四环素	4(6.15)	0(0.00)	61(93.85)	阿奇霉素	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
多黏菌素E	18(27.70)	47(72.30)	0(0.00)	替加环素	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
厄他培南	2(3.08)	0(0.00)	63(96.92)	萘啶酸	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
头孢他啶	6(9.23)	0(100.00)	59(90.77)	链霉素	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
头孢噻肟	6(9.23)	0(0.00)	59(90.77)	阿米卡星	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
氨苄西林/舒巴坦	8(12.31)	0(0.00)	57(87.69)	头孢他啶/阿维巴坦	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)
复方新诺明	0(0.00)	0(0.00)	65(100.00)				

表3 标准菌株副溶血性弧菌(ATCC17802)的耐药谱

抗生素	氯霉素	复方新诺明	多黏菌素E	厄他培南	美罗培南	头孢噻肟	头孢他啶	头孢他啶/阿维巴坦	四环素
MIC	≤4	≤0.5/9.5	2	≤0.25	≤0.12	≤0.25	≤0.25	≤0.25/4	≤1
敏感性	S	S	I	S	S	S	S	S	S
抗生素	萘啶酸	环丙沙星	替加环素	阿奇霉素	阿米卡星	链霉素	氨苄西林	氨苄西林/舒巴坦	
MIC	≤4	0.25	≤0.25	≤2	≤4	≤4	4	≤2/1	
敏感性	S	S	S	S	S	S	S	S	

2.4 PFGE分子分型结果分析

65株副溶血性弧菌经*Not I*酶切后,DNA条带得到较好地分离,经电泳得到不同的PFGE图谱,如图1所示,菌株条带数目15~22,用BioNumerics 6.6软件的Cluster analysis进行聚类分析,菌株之间相似度为34.67%~100.0%,按照100%的相似度,可将酶切图谱分为63个PFGE型别。其中VP-44与VP-46,VP-63与VP-64为相同型别,其余型别为相近关系或可能为相近关系。

3 讨论

本文中2017—2021年泉州地区水产品中副溶血性弧菌的总检出率为30.95%,比胡婕等^[2]报道的荆州市水产品检出率22.5%高出8.45%,表明泉州地区存在副溶血性弧菌污染情况。据调查,泉州是我国主要沿海城市之一,近年来水产品的生产量和

2.3 药敏试验分析

本研究选取了《国家致病菌识别网技术手册》推荐的17种抗生素。药敏结果显示65株副溶血性弧菌对8种抗生素表现出不同程度的耐药(表2),其中耐药最强的是多黏菌素E(27.70%,18/65),其次为氨苄西林(21.54%,14/65),对氨苄西林/舒巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、氯霉素、四环素、厄他培南也存在一定的耐药。结果显示65株沙门菌对美罗培南、环丙沙星、头孢他啶/阿维巴坦、替加环素、阿奇霉素、萘啶酸、链霉素、复方新诺明和阿米卡星9种抗生素比较敏感,不存在耐药。本实验还选取副溶血性弧(ATCC17802)作为标准菌株对照,其耐药谱如表3所示。

消费量逐年增多,水产品养殖、收购、运输、储藏、加工、销售等环节中均容易造成交叉污染^[6]。

本次检测食品中贝类产品副溶血性弧菌检出率最高,污染较严重,其次是甲壳类(主要为虾类),可能因为甲壳类和贝类长期生长在浅海或滩涂区域,生活垃圾和生活污水容易造成污染。

根据目前研究认为,与副溶血性弧菌的致病能力关系密切主要是*tdh*和*trh*基因,*tlh*基因位于染色体上,本身不具备溶血活性,不论是在临床株还是环境株中,均能被检出,具有种属特异性^[2]。也有研究表明副溶血性弧菌环境株大部分是非致病性的^[1]。本文中65株副溶血性弧菌均检测出*tlh*毒力基因,而*tdh*和*trh*基因均未检出,说明泉州地区市售水产品及中间环节中副溶血性弧菌大多是非致病性的。

研究表明从食品分离出的副溶血性弧菌对部

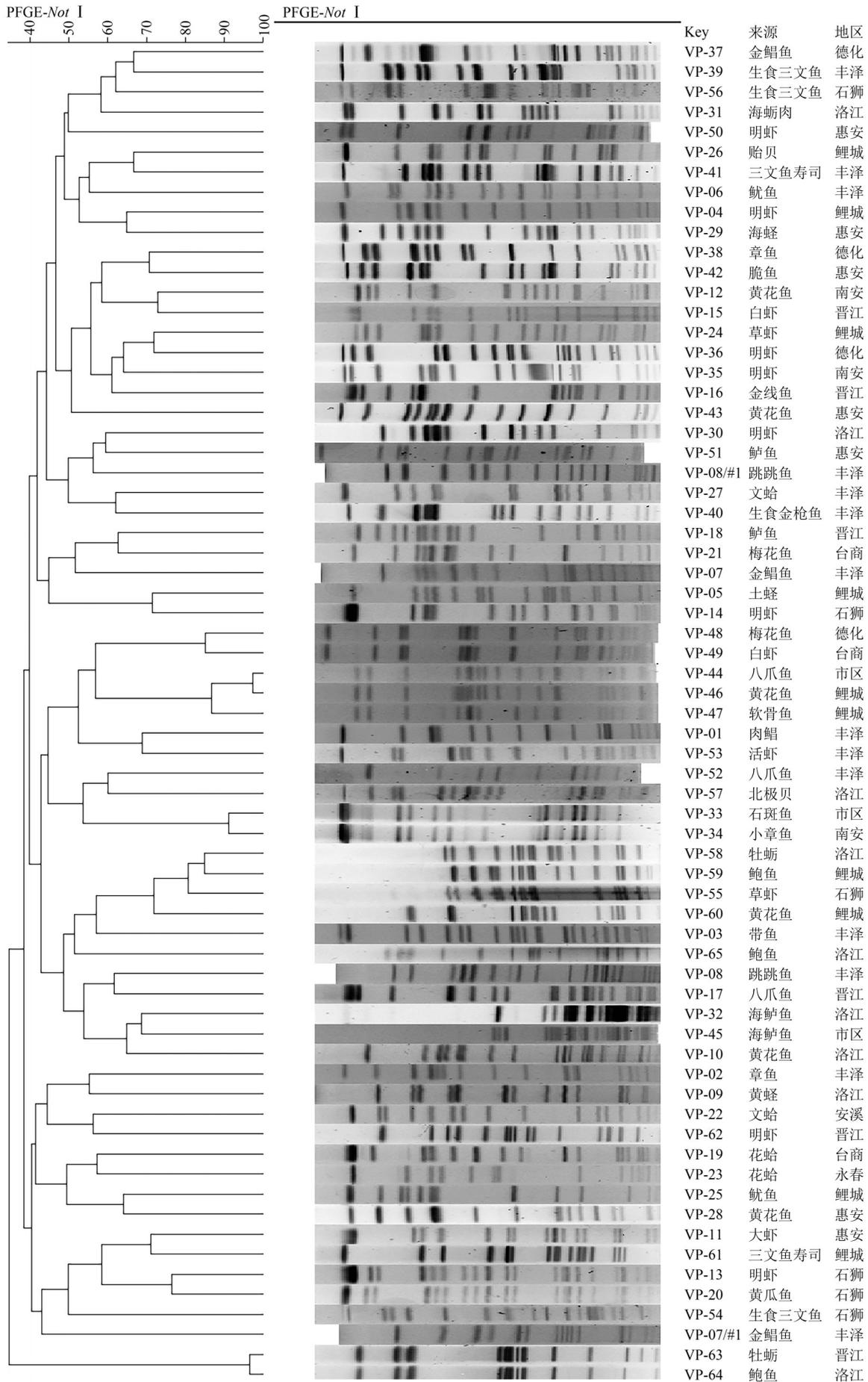


图1 65株副溶血性弧菌的PFGE聚类图谱

Figure 1 PFGE cluster of 65 strains of *Vibrio parahaemolyticus*

分抗生素存在一定程度的耐药(耐药率 1.54%~27.70%),推测可能是因为水产品养殖中使用抗生素导致细菌产生耐药性,研究结果也表明 65 株菌株对美罗培南、环丙沙星、头孢他啶/阿维巴坦、替加环素、阿奇霉素、萘啶酸、链霉素、复方新诺明和阿米卡星 9 种抗生素具有高度敏感性,提示临床用药可以优先考虑该 9 种抗生素。

研究表明 PFGE 已用于多种致病菌的分子分型,可对不同来源的分离株进行基因水平的分子指纹图谱分析^[8],用于菌株之间的亲缘关系鉴定以及流行病学的溯源。根据 TENOVER 等^[9]的判定标准,PFGE 图谱中具有 85% 以上相同条带的菌株认为是相同菌株,50% 以上的条带不相同时,菌株被认为流行病学不相关,介于这两者之间的为相似菌株^[10]。本文从水产品中分离的 65 株副溶血性弧菌经 PFGE 电泳得到 63 种型别的图谱,聚类分析显示非常分散,最高相似度可达到 100%,最低相似度为 34.6%,低于 50% 均为不相关菌株,说明副溶血性弧菌在环境中呈现多态性分布,菌株之间亲缘关系较远。

副溶血性弧菌是引起我国特别是沿海地区细菌性食物中毒危害的首要食源性致病菌,也是全国食品安全风险监测的常规项目,对副溶血性弧菌的研究和重视,有助于降低食源性疾病的风险,尤其对副溶血性弧菌致病因子和分子分型的研究将有待进一步探索。

4 参考文献

- [1] 陈晶,黄建飞,刘丛丛,等. 食品来源副溶血性弧菌毒力基因分布及分子分型研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 239-241.
CHEN J, HUANG J F, LIU C C, et al. Study on virulence genes distribution and molecular subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* from different food resources [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(6): 239-241.
- [2] 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.
HU J, CHEN M Y, CHEN T, et al. Study on the contamination and distribution of virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* in inland marketing aquatic products and environment [J]. Journal of Public Health and Preventive Medicine, 2013, 24(4): 33-37.
- [3] 徐海滨,杨劲松,陈爱平,等. 福建省 74 株霍乱弧菌 PFGE 分子分型研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(6): 1-3.
XU H B, YANG J S, CHEN A P, et al. Study on molecular typing of 74 *Vibrio cholerae* strains by using PFGE method in Fujian [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2017, 23(6): 1-3.
- [4] 董洪燕,张雪梅,马智龙,等. 一起副溶血弧菌引起的食物中毒溯源分析[J]. 现代预防医学, 2017, 44(11): 1955-1958.
DONG H Y, ZHANG X M, MA Z L, et al. PFGE analysis of a food poisoning event caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Modern Preventive Medicine, 2017, 44(11): 1955-1958.
- [5] 江艳华,姚琳,李凤铃,等. 副溶血性弧菌的耐药状况及耐药机制研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(4): 96-102.
JIANG Y H, YAO L, LI F L, et al. Research progress on antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* and its mechanism [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2013, 3(4): 96-102.
- [6] 陈韵妍,吴小凤,郑友限,等. 泉州市 2013—2016 年食品中副溶血性弧菌污染状况和毒力基因分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2017, 23(5): 72-74.
CHEN Y Y, WU X F, ZHENG Y X, et al. Contamination status and virulence gene analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in food in Quanzhou from 2013 to 2016 [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2017, 23(5): 72-74.
- [7] 庄春红,吴小凤,郑迎翔,等. 福建省泉州地区 2013—2016 年沙门氏菌的 PFGE 分子分型及耐药性研究[J]. 医学动物防制, 2019(6): 540-543.
ZHUANG C H, WU X F, ZHENG Y X, et al. Study on PFGE molecular typing and drug resistance of *Salmonella* in Quanzhou Area of Fujian Province from 2013 to 2016 [J]. Journal of Medical Pest Control, 2019(6): 540-543.
- [8] 杨月莲,于志刚,刘辉,等. 引起一起食物中毒的副溶血性弧菌病原学检测和分子分型溯源研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(9): 827-829.
YANG Y L, YU Z G, LIU H, et al. Etiological detection and traceability research of an outbreak of foodborne diseases caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Pathogen Biology, 2013, 8(9): 827-829.
- [9] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [10] 耿英芝,于淼,张铭琰,等. 2016—2020 年辽宁省沙门菌耐药性及分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(3): 426-431.
GENG Y Z, YU M, ZHANG M Y, et al. Drug resistance characteristics and molecular typing of *Salmonella* in Liaoning Province from 2016 to 2020 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(3): 426-431.