

上海市售水产品中 副溶血性弧菌耐药性分析

卢奕¹, 陈玮祎¹, 刘海泉^{1,2,3,*}, 谢晶^{1,2,3}, 赵勇^{1,2,3,*}, 孙晓红^{1,2,3}

(1.上海海洋大学食品学院, 上海 201306;

2.上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306;

3.农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306)

摘要:为了解上海市售水产品中副溶血性弧菌的耐药情况,通过药敏纸片扩散法(K-B法)对上海市某水产品市场连续两年监测分离获得的45株副溶血性弧菌进行了25种常用抗生素的药敏实验。结果显示,所有实验菌株都对青霉素G和甲硝唑耐药,有高达90%以上的菌株对帕拉西林、新霉素和卡那霉素耐药,而对利福平、万古霉素、四环素、强力霉素、头孢拉定和土霉素全部敏感;同时发现不同来源的菌株,其耐药谱存在一定程度的差异,菌株多重耐药性与菌株致病因子类型间也存在一定的相关性。因此,应进一步加强水产品中细菌耐药性的监测,并采取更有效措施控制细菌耐药性。

关键词:水产品,副溶血性弧菌,耐药性

Surveillance and analysis on drug-resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the commercial aquatic products in markets of Shanghai

LU Yi¹, CHEN Wei-yi¹, LIU Hai-quan^{1,2,3,*}, XIE Jing^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3,*}, SUN Xiao-hong^{1,2,3}

(1.College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2.Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China;

3.Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation(Shanghai), Ministry of Agriculture Shanghai 201306, China)

Abstract:The aim of this study was to survey and analyze the antibacterial resistance of *Vibrio parahaemolyticus*, which were isolated from the commercial aquatic products in Shanghai markets.45 *V.parahaemolyticus* strains were isolated in two years, and all the isolates were carried out for 25 kinds of antibiotic susceptibility pattern using modified Kirby-Bauer disk diffusion method.The results showed that all strains were resistance to Penicillin G and Metronidazole.More than 90% of the *V.parahaemolyticus* isolates were resistant to Piperacillin, Neomycin and Kanamycin, and all strains were sensitive to Rifampicin, Vancomycin, Tetracycline, Doxycycline, Cephadrine and Oxytetracycline.Moreover, antibiotic resistance patterns of the strains existed a certain differences among isolation origin.And there was a certain relation between the multi-drug resistance and pathogenic types of the strains.For this reason, it is important to take measures to strengthen monitor the antibacterial resistance of *V.parahaemolyticus* in the contaminated aquatic products.

Key words: aquatic products; *Vibrio parahaemolyticus*; antibiotic resistance

中图分类号:TS254.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2016)19-0271-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2016.19.045

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)属于弧菌科弧菌属,是一种革兰氏阴性菌,嗜盐^[1]。副溶血

性弧菌不仅是水产养殖中常见的病原菌,同时也是引起沿海地区食物中毒的主要食源性致病菌^[2]。生

收稿日期:2016-04-25

作者简介:卢奕(1995-),女,本科,研究方向:食品安全风险评估,E-mail:cindy.luyi@foxmail.com。

* 通讯作者:刘海泉(1980-),男,博士,讲师,研究方向:食品安全,E-mail:hqliu@shou.edu.cn。

赵勇(1975-),男,博士,教授,研究方向:食品安全与生物技术,E-mail:yzhao@shou.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31271870, 31571917, 31671779);上海市科委计划项目(14DZ1205100, 14320502100);上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字2014第3-5号、2015第4-8号、2016第1-1号);上海市教委曙光计划(15SG48);上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心(11DZ2280300)。

食或未充分烹饪被副溶血性弧菌污染的食品(主要为水产品)是导致食物中毒的主要原因^[3]。据国家卫生和计划生育委员会统计,2015年微生物性食物中毒事件的中毒人数最多,副溶血性弧菌为主要致病因子之一^[4]。通过对上海市市售食品中食源性致病菌污染状况的调查,结果表明74.84%的食品安全事件由微生物导致,其中副溶血性弧菌导致的食物中毒事件占到微生物因素的33.33%^[5],可见副溶血性弧菌在我国仍是主要的食源性致病菌。

溶血毒素是副溶血性弧菌的主要致病因子;溶血毒素主要有耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)、耐热直接溶血素相关溶血毒素(TDH-related hemolysin, TRH)及不耐热溶血素(hermolabile hemolysin, TLH);其中TDH和TRH是与副溶血性弧菌致病性密切相关的毒力因子^[6]。抗生素是由微生物或高等动植物在生活过程中所产生的具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物,能干扰其他生活细胞发育功能的化学物质^[7]。目前,主要使用抗生素来预防和控制副溶血性弧菌引发的病害,但抗生素的不正确使用使副溶血性弧菌更容易获得耐药性,并且其耐药性可通过食物链转移给人类^[8]。

因此,为监测水产品中副溶血性弧菌的耐药性状况,本研究从上海市某水产品市场连续两年采集并分离得到45株副溶血性弧菌,选取了6大类25种药敏片,分别从菌株分离来源、致病因子类型等角度分析其耐药情况,为控制副溶血性弧菌耐药性、指导抗生素的合理使用提供一定的基础数据,从而更好地控制副溶血性弧菌对人类和水产动物的危害。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐蔗糖琼脂(TCBS琼脂) 购于北京陆桥技术股份有限公司;Mueller Hinton肉汤、药敏片 购于英国OXOID公司。

VS-100L-U超净工作台 江苏苏净集团;MLS-3750型压力蒸汽灭菌器、MIR-154型高精度低温培养箱 日本三洋Sanyo公司;6325型聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、5424型离心机、微量移液器 德国Eppendorf公司;PL2002型电子天平瑞士Mettler Toledo公司;Sub-Cell® GT型电泳仪、Gel Doc™ XR型凝胶成像分析系统 美国Bio-Rad公司。

从上海市某水产品市场连续两年分离得到45株副溶血性弧菌,以及从食用了被该菌污染的食品或者食用了含有该菌的食品后出现中毒症状的病人分离到的2株副溶血性弧菌,作为对照,详见表1。抗菌素敏感实验质控标准菌株大肠埃希氏菌ATCC25922。

1.2 实验方法

1.2.1 样品中副溶血性弧菌的鉴定 根据GB/T 4789.7-2013《食品卫生微生物学检验:副溶血性弧菌

表1 副溶血性弧菌菌株基本信息

Table 1 Informations of *Vibrio parahaemolyticus* strains

菌株编号	菌株分离来源	致病基因		
		<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
1	斑节对虾	+	-	-
2	日本沼虾	+	+	-
3	基尾虾	+	-	-
4	日本沼虾	+	-	-
5	日本沼虾	+	-	-
6	日本沼虾	+	-	-
7	罗氏沼虾	+	-	-
8	斑节对虾	+	-	-
9	罗氏沼虾	+	-	-
10	斑节对虾	+	-	-
11	日本沼虾	+	-	-
12	罗氏沼虾	+	-	-
13	斑节对虾	+	-	-
14	罗氏沼虾	+	-	-
15	斑节对虾	+	-	-
16	罗氏沼虾	+	-	-
17	日本沼虾	+	-	-
18	日本沼虾	+	+	-
19	斑节对虾	+	-	-
20	日本沼虾	+	-	-
21	斑节对虾	+	-	+
22	罗氏沼虾	+	-	-
23	白米虾	+	-	-
24	罗氏沼虾	+	-	+
25	罗氏沼虾	+	-	+
26	罗氏沼虾	+	-	+
27	罗氏沼虾	+	-	+
28	罗氏沼虾	+	-	+
29	罗氏沼虾	+	-	+
30	罗氏沼虾	+	-	+
31	南美白对虾	+	-	-
32	罗氏沼虾	+	-	-
33	罗氏沼虾	+	-	+
34	罗氏沼虾	+	-	+
35	南美白对虾	+	-	-
36	南美白对虾	+	-	-
37	南美白对虾	+	-	-
38	南美白对虾	+	-	-
39	南美白对虾	+	+	-
40	南美白对虾	+	+	-
41	南美白对虾	+	+	-
42	南美白对虾	+	+	-
43	南美白对虾	+	+	-
44	南美白对虾	+	+	-
45	南美白对虾	+	+	-
46*	病人	+	+	+
47*	病人	+	+	+

注: + 含有该基因, - 不含有该基因; * 菌株46和47, 作为对照菌株。

检验》方法^[9],分离获得疑似副溶血性弧菌;对疑似菌株的 16S rDNA 测序后,通过 NCBI 数据库比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),最终确定是否为副溶血性弧菌。

1.2.2 菌液的制备 取于-80℃、25%甘油保存的菌种,接种于3% NaCl 的 TSB 肉汤,在37℃下复苏后,划线接种于3% NaCl 的 TSA 平板,挑取单菌落接种于 TSB 肉汤中,在37℃下培养至对数期,连续活化2次。最后将副溶血性弧菌划线接种与 TCBS 平板上,挑取单菌落于10 mL TBS 试管中,37℃、180 r/min 摇床培养16 h,得到 OD 为 1.1~1.4 的菌液,作为种子液,备用^[10]。

1.2.3 药敏实验 采用 WHO 推荐的 K-B 氏纸片法^[11],并参考本实验室方法^[12]:将种子液浊度调至为 1.5×10^8 CFU/mL (OD 值约为 0.33~0.34),用棉拭子蘸取一定量的菌液均匀涂到约 4 mm 厚的 MHA 平板,待干后,将药敏纸片贴于平板上,重复操作五次。放置于 37℃ 的恒温培养箱中培养 18 h 后,测量抑菌圈直径。药敏实验的质控方法和结果判定依据美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 微生物敏感实验的执行标准,以标准敏感菌株大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌。

2 结果与分析

2.1 副溶血性弧菌耐药性概况

依据美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 微生物敏感实验的执行标准进行判定,本研究质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 的药敏实验结果符合美国临床实验室标准化委员会 (NCCLS) 微生物敏感实验执行标准提供的参考数值范围。根据药敏片的种类,副溶血性弧菌耐药性整体概况如表 2 所示。所有实验菌株均耐青霉素 G 和甲硝唑,有高达 90% 以上的菌株对帕拉西林、新霉素和卡那霉素耐药,而对利福平、万古霉素、四环素、强力霉素、头孢拉定和土霉素全部敏感。

2.2 菌株耐药性与菌株分离来源的关联分析

结果表明不同分离来源的副溶血性弧菌对 17 种抗生素表现出不同程度的耐药性 (见图 1)。其中从罗氏沼虾中分离得到的 16 株副溶血性弧菌对 15 种抗生素产生了耐药性;来源于南美白对虾的 12 株对 15 种抗生素耐药;来源于斑节对虾的 7 株对 14 种抗生素耐药;来源于日本沼虾的 8 株对 13 种抗生素耐药;来源于白米虾的 1 株 11 种抗生素耐药;来源于基尾虾的 1 株对 8 种抗生素耐药;来源于病人的 2 株对 9 种抗生素耐药;分离自罗氏沼虾副溶血性弧菌

表 2 副溶血性弧菌的耐药性分析及耐药菌株比例

Table 2 Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* antibiotic resistance

抗生素	菌株数			耐药率 (%)	
	R	I	S		
青霉素类	AML(阿莫西林)	14	2	31	29.79
	AMP(氨苄西林)	39	7	1	82.98
	P(青霉素 G)	47	0	0	100.00
	PRL(帕拉西林)	46	1	0	97.87
头孢菌素类	SAM(舒巴坦/氨苄西林)	2	1	44	4.26
	KF(头孢噻吩)	2	18	27	4.26
	CE(头孢拉定)	0	0	47	0.00
氨基糖苷类	S(链霉素)	3	28	16	6.38
	N(新霉素)	45	1	1	95.74
大环内酯类	K(卡那霉素)	43	4	0	91.49
	E(红霉素)	0	2	45	0.00
	SP(螺旋霉素)	0	17	30	0.00
	CIP(环丙沙星)	21	18	8	44.68
奎诺酮类	NOR(诺氟沙星)	21	17	9	44.68
	NA(萘啶酸)	2	14	31	4.26
	ENR(恩诺沙星)	3	8	36	6.38
其它类	SXT(甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲基异恶唑)	16	24	7	34.04
	VA(万古霉素)	0	0	47	0.00
	MTZ(甲硝唑)	47	0	0	100.00
	TE(四环素)	0	0	47	0.00
	DO(强力霉素)	0	0	47	0.00
	C(氯霉素)	1	0	46	2.12
	RD(利福平)	0	0	47	0.00
	PB(多粘菌素 B)	40	7	0	85.11
	OT(土霉素)	0	0	47	0.00

注:表中 R 为耐药, I 为中介, S 为敏感;耐药率 (%) = 耐药菌株数 (R) / 菌株总数 × 100。

的耐药谱最复杂,分离来源于基尾虾的菌株耐药谱相对简单。且所有来源的菌株对青霉素 G、甲硝唑、帕拉西林、新霉素、卡那霉素和氨苄西林这六种抗生素均存在不同程度的耐药。

分离来源于南美白对虾的副溶血性弧菌分别有 83.3% 和 100.0% 的菌株对头孢噻吩和氯霉素产生了耐药,而其它分离来源的菌株对这两种抗生素普遍敏感;但对于多粘菌素 B,分离来源于南美白对虾的副溶血性弧菌却表现为完全敏感,而其他分离来源的菌株却表现出一定程度的耐药。

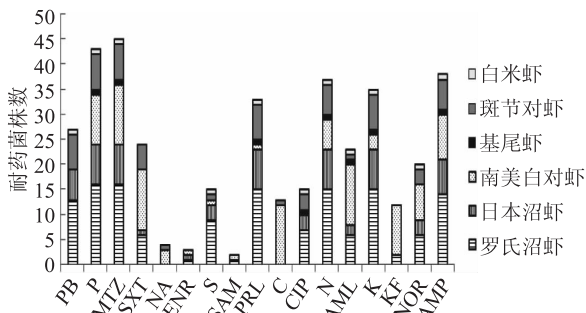


图1 菌株来源与耐药性关联分析
Fig.1 Analysis on the relationship between strains isolation and antibiotic resistance

2.3 多重耐药性分析

根据副溶血性弧菌溶血毒素致病基因不同将菌株分为四种类型: $tdh^+/trh^-/tlh^+$, $tdh^-/trh^+/tlh^+$, $tdh^+/trh^+/tlh^+$ 和 $tdh^-/trh^-/tlh^+$ ^[13]。由图 2 可以看出 $tdh^-/trh^+/tlh^+$ 和 $tdh^-/trh^-/tlh^+$ 类型的菌株耐药谱最复杂。菌株多重耐药性与致病基因类型可能存在一定的关联,其中 $tdh^-/trh^+/tlh^+$ 有促使副溶血性弧菌对更多抗生素产生耐药性的可能。

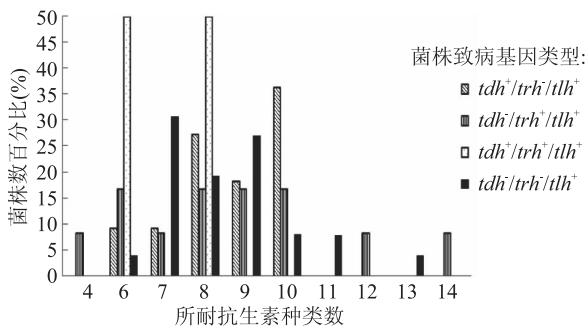


图2 菌株致病基因类型与多重耐药性的关联分析
Fig.2 The strains of the pathogenic types and proportion of multi-drug resistance

2.4 Heat-map 菌株耐药分析情况

本研究使用 Heat-map 清晰地呈现副溶血性弧菌菌株的耐药谱(图 3)。其对青霉素 G 和甲硝唑的耐药率达到 100%,但对帕拉西林、新霉素、卡那霉素和氨苄西林的抗性更强;而本研究中分离得到的副溶血性弧菌菌株对利福平、四环素、强力霉素、舒巴坦/氨苄西林和氯霉素的敏感度较高。

菌株 4 与 29 间,5 与 45 间,11 与 15 间,17 与 23 间,18 与 39 间耐药谱高度相似,其中菌株 4、5、11、17、18 均分离自日本沼虾,而菌株 15 分离自斑节对

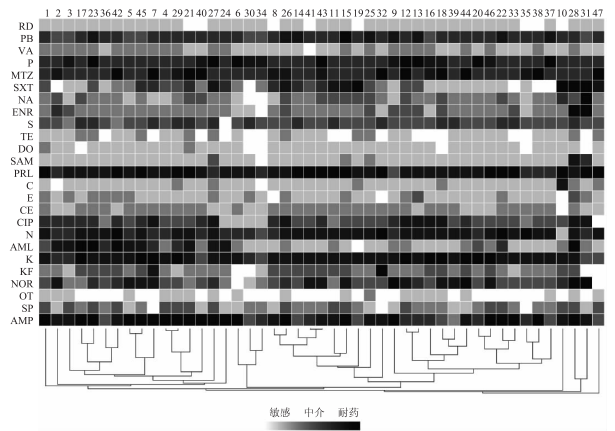


图3 47 株副溶血性弧菌对 25 种抗生素的耐药性热图分析
Fig.3 The antibiotic resistance heat map of 47 *Vibrio parahaemolyticus* strains to 25 kinds of antibiotics

虾,23 分离自白米虾,29 分离自罗氏沼虾,39、45 分离自南美白对虾,可见分离来源于日本沼虾的菌株与其它分离来源的菌株间出现相似性,推测可能是养殖环境所导致。

分离自日本沼虾的菌株 20 与分离自病人的菌株 46 的耐药谱也出现一定程度的相似性,均对青霉素类、氨基糖苷类和其它类三大类抗生素表现出较强的耐药性。早期认为,细菌耐药性的出现,与抗生素作用位点的点突变有关,但随着抗生素的滥用情况日趋严重,点突变的发生率已无法解释细菌多重耐药性的普遍发生,因此,细菌可移动遗传元件可以在同种或不同种菌株间水平转移,成为多重耐药性产生的主要原因^[14];而从另一个角度分析,人们缺乏正确使用抗生素的意识,意大利学者的一项调查中显示,26.9% 的人不清楚抗生素的滥用会导致细菌耐药^[15]。

3 结论与讨论

目前,抗生素的滥用、乱用加重了细菌耐药性的问题,特别是由于多重耐药菌株感染而导致死亡报道逐年增加^[16],引起了世界广泛的关注,已成为世界性的难题^[17]。食源性致病菌的耐药性对食品安全以及人类身体健康的影响已经引起了人们的重视^[18]。本研究从养殖业,医疗等领域可能使用的抗生素中选取了 25 种抗生素进行了耐药性实验,结果表明无论从水产品还是病人中分离到的副溶血性弧菌都存在一定程度的耐药问题,且菌株耐药谱有显著差异,因此菌株多重耐药性的产生具有复杂性和多样性。

农业部对养殖中抗生素的使用有严格的规定,其中氯霉素、万古霉素、头孢噻吩、头孢拉定和利福平均为禁用抗生素^[19],实验结果表明(表 2),菌株对万古霉素、头孢拉定和利福平未产生耐药性,而氯霉素的耐药率为 2.12%,出现 1 株耐药、46 株敏感,细菌耐药性的出现可能是细菌自身的原因^[20];头孢噻吩的耐药率为 4.26%,出现 2 株耐药、18 株中介、27 株敏感,可能是由于违规排放而导致养殖环境中出现该抗生素,也可能是由于养殖过程中抗生素违规使用。2015 年 9 月 1 日,农业部发布 2292 公告,禁

用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星和诺氟沙星等四种抗生素。四者都属于第三代喹诺酮的氟喹诺酮类基本药物,在人类医疗中占有较重地位^[21]。本研究连续两年监测结果显示,针对 NOR(诺氟沙星),47株副溶血性弧菌的耐药情况为,21株耐药、17株中介、9株敏感,耐药率高达44.68%。

近来,有不少抗生素的辅助试剂相继研发问世,也从侧面反映出由于耐药性的产生而导致抗生素的药效下降,甚至失效等问题^[22]。本研究通过连续两年对上海某水产品市场的监测结果表明,上海市售水产品中副溶血性弧菌已经出现多重耐药性,且不同分离来源的菌株耐药谱存在一定的差异。及时了解掌握细菌的耐药性情况,对指导农业和医学领域合理应用抗生素,提高疗效,维持细菌对抗生素的敏感性,减少耐药菌株的产生具有重大意义。

参考文献

[1] Honda T, Iida T. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins [J]. *Reviews in Medical Microbiology*, 1993, 4(2): 106-113.

[2] Tran L, Nunan L, Redman R M, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp [J]. *Diseases of aquatic organisms*, 2013, 105(1): 45-55.

[3] FAO/WHO. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: interpretative summary and technical report [M]. Rome: Microbiological Risk Assessment Series No.16, 2011.

[4] 国家卫生计生委办公厅, 关于2015年全国食物中毒事件情况的通报 [EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/yjb/s7859/201604/8d34e4c442c54d33909319954c43311c.shtml>, 国卫办应急发[2016]5号, 2016-04-01.

[5] 上海市食品安全委员会办公室, 上海市食品药品监督管理局. 2014年上海市食品安全白皮书 [EB/OL]. <http://www.shfda.gov.cn/WDSearch/search.ashx>, 2014-02-02.

[6] 刘海泉, 刘冰宣, 吕利群, 等. 上海市生食三文鱼中副溶血性弧菌污染的风险分析 [J]. *食品科学*, 2015, 36(24): 195-199.

[7] 冯美珍, 戴光华. 抗生素的合理应用 [J]. *井冈山医学学报*, 2000, 7(3): 33-35.

[8] Soom H, L'abee-land T M. Antibiotic resistance in food-

related bacteria result of interfering with the global web of bacteria genetics [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(1-2): 43-56.

[9] GB/T 4789.7-2013, 食品卫生微生物学检验: 副溶血性弧菌检验 [S].

[10] 郭丹凤, 张昭寰, 肖莉莉, 等. 不同耐药性致病性副溶血性弧菌的生长特性比较研究 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(19): 137-141.

[11] 管远志, 王艾琳, 李坚. 医学微生物学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006, 108-115.

[12] 张昭寰, 郭丹凤, 王敬敬, 等. 改良 K-B 法用于副溶血性弧菌耐药性检测 [J]. *微生物学杂志*, 2014, 34(1): 78-83.

[13] Ma F L, Liu H Q, Wang J J, et al. Behavior of *Vibrio parahaemolyticus* cocktail including pathogenic and nonpathogenic strains on cooked shrimp [J]. *Food Control*, 2016, 68: 124-132.

[14] Siguier P, Filee J, Chandler M. Insertion sequences in prokaryotic genomes [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(5): 526-531.

[15] Gualano M R, Gili R, Scaioli G, et al. General population's knowledge and attitudes about antibiotics: a systematic review and meta-analysis [J]. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 2015, 24(1): 2-10.

[16] 刘秀梅, 陈艳, 郭云昌, 等. 2005年中国食源性疾病暴发事件监测资料分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2008, 20(6): 506-509.

[17] Neu H C. The crisis in antibiotic resistance [J]. *Science*, 1992, 257(5073): 1064-1073.

[18] 赵静, 孙海娟, 冯叙桥. 食品中食源性致病菌污染状况及其监测技术研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(5): 1353-1360.

[19] 中华人民共和国农业部, 中华人民共和国农业部公告第560号 [EB/OL]. http://www.moa.gov.cn/zwl/m/tzgg/gg/200511/t20051117_496523.htm, 2005-11-01.

[20] Levy S B. Antibacterial household products: cause for concern [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, 7(3): 512-515.

[21] 中华人民共和国农业部, 中华人民共和国农业部公告第2292号 [EB/OL]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm, 2015-09-07.

[22] 冉陆. 食源性致病菌及其耐药性 [J]. *预防医学文献信息*, 2001, 7(5): F002-F002.

因本刊已被《中国知网》(包括“中国知网”
优先数字出版库)独家全文收录, 所以所付稿酬中
已包含该网站及光盘应付的稿酬。